



Stéphanie Rosalina
Nunes Fernandes

Implementação e validação de um novo
método para determinação de dextrose
equivalente em cereais hidrolisados
enzimaticamente



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2017



Stéphanie Rosalina
Nunes Fernandes

Implementação e validação de um novo
método para determinação de dextrose
equivalente em cereais hidrolisados
enzimaticamente

Relatório de estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação do Mestre Hugo Ricardo Viegas Gomes Costa, Responsável de métodos analíticos alternativos da fábrica da Nestlé de Avanca.

Dedico esta tese à minha querida avó Maria José.

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Eduarda Pereira
professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus pais, devo a eles a vida que tenho hoje, obrigada por toda a força, amor e educação que me transmitiram ao longo deste tempo. Ao meu irmão mais novo, Daniel, pelo amor, pelas brincadeiras, por todos os momentos. Aos meus avós, pela incansável preocupação diária do meu bem-estar. A minha avó Zé, agradeço por todos os momentos e que continues a dar-me força e a olhar por mim, estejas onde estiveres.

Ao Tiago, não há palavras que descrevam todo o apoio constante e toda a força que me deu para ultrapassar todas as barreiras encontradas durante estes anos todos. Obrigada pelo amor, pela compreensão e por fazeres parte da minha vida.

Agradeço a todas as minhas amigas, Inês, Renata e Sara, pela amizade, pelas palavras nos momentos mais difíceis e pelo carinho que sempre depositaram em mim.

À Doutora Ivonne Delgadillo, orientadora deste projeto, não há palavras que descrevam todo o apoio incondicional, ajuda e disponibilidade que ofereceu durante este mestrado e para a realização deste projeto. O meu sincero obrigado por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim, pela paciência e pelas palavras de incentivo e de amizade que me deu.

Ao Mestre Hugo Costa, orientador na empresa, agradeço a orientação deste trabalho, os ensinamentos e o apoio prestado durante este estágio.

À Doutora Fátima Sodré, chefe do Departamento de Qualidade, agradeço por me ter recebido neste departamento, por ter proporcionado a realização deste projeto, pela disponibilidade e apoio.

Ao Hugo Ferreira e especialmente à Andreia Paço, pela amizade construída, pelo apoio incansável, pelas palavras de conforto e motivação nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de laboratório, Pedro e Fátima, pelos ensinamentos preciosos, pelo companheirismo diária e pelos momentos de boa disposição.

  Lili e   Dina, duas verdadeiras guerreiras, agradeço todo o apoio e os momentos de boa disposição.

Ao Filipe Silva pelo companheirismo e momentos de boa disposição.

Ao Rogério Gonzalez pela incansável disponibilidade e apoio prestado em diversas fases do presente trabalho

Agradeço a todos aqueles que me acompanharam no dia-a-dia, quer no Departamento de Qualidade, quer no Setor de Fabricação de CHE. E   toda a equipa Nestlé.

palavras-chave Cereais hidrolisados enzimaticamente; dextrose equivalente; método potenciométrico; validação de métodos;

resumo São inúmeras as situações em que um laboratório necessita de implementar metodologias analíticas novas, com o intuito de se obterem resultados com o maior rigor analítico possível. Para tal, é necessário conhecer a resposta e a performance do método analítico que se pretende implementar.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na implementação de um método potenciométrico, para a determinação de dextrose equivalente em cereais hidrolisados enzimaticamente.

O método potenciométrico consiste na medição do potencial entre dois elétrodos em função do volume de reagente adicionada. A análise quantitativa dos açúcares foi realizada em duas diferentes titulações: uma primeira titulação com a solução padrão de glucose (1mg/mL) e uma segunda titulação que consiste na titulação da amostra. O cálculo do teor de açúcares redutores é feito por comparação dos valores obtidos nas duas titulações.

Na avaliação do desempenho do método potenciométrico, as principais características avaliadas foram a precisão, limiares analíticos, a veracidade e a incerteza de medição.

Do processo de validação foram definidos os seguintes critérios base para a implementação em rotina da metodologia analítica: limite de repetibilidade inferior a 0,3 e 0,9 g/ 100g MS para CHE em pó e sopas de CHE, respetivamente; limite de deteção de 0,66 e quantificação de 1,53 g/ 100g MS; recuperação de 101,6 % e incerteza 0,33 g/100 g MS.

Para além disso, na análise de regressão linear do método potenciométrico com o método de Lane-Eynon obteve-se um coeficiente de correlação de 0,8824.

keywords Cereals enzymatically hydrolyzed; Dextrose equivalent; Potentiometric methods; Validation of methods;

abstract

There are many situations in which a laboratory needs to implement new analytical methodology, in order to obtain results with the highest analytical rigor possible. For this, it is necessary to know the response and performance of the analytical method to be implemented.

The main objective of this work was the implementation of an potentiometric method for the determination of the equivalent dextrose in enzymatically hydrolyzed cereals.

The potentiometric method consists of measuring the potential between two electrodes as a function of the volume of added reagent. Quantitative analysis of sugars was performed in two different titrations: a first titration with the standard glucose solution (1mg/mL) and a second titration consisting of titration of the sample. The calculation of the reducing sugars content is done by comparing the values obtained in the two titrations.

In the evaluation of the performance of the potentiometric method, the main characteristics evaluated were precision, analytical limits, trueness and measurement uncertainty.

From the validation process, the following basic criteria were defined for the routine implementation of the analytical methodology: repeatability limit less than 0,3 and 0,9 g / 100 g DM for CHE powder and CHE soups, respectively; Detection limit of 0,66 and quantification of 1,53 g / 100g DM; Recovery of 101,6% and uncertainty 0,33 g / 100 g DM.

In addition, in the linear regression analysis of the potentiometric method with the Lane-Eynon method, a correlation coefficient of 0,8824 was obtained.

Lista de abreviaturas e símbolos

°Brix – Grau Brix

r – Limite de repetibilidade

iR – Limite de reprodutibilidade

R – Reprodutibilidade

BIPEA – do francês, *Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques* – Escritório interprofissional dos estudos analíticos

CHE – Cereais Hidrolisados Enzimaticamente

CV – Coeficiente de Variação

DE – Dextrose Equivalente

DM – do inglês, *Dry Matter* – Matéria Seca

FAPAS – do inglês, *Food Analysis Performance Assessment Scheme* - Esquema de Avaliação do Desempenho em Análise de Alimentos

HACCP - do inglês, *Hazard Analysis and Critical Control Point* – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

ISO – do inglês, *International Organization for Standardization* – Organização Internacional de Normalização

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MRC – Material de Referência Certificado

MS – Matéria Seca

RSD – do inglês, *relative standard deviation* - desvio padrão relativo

SD – do inglês, *standard deviation* - desvio padrão

Índice

Resumo.....	11
Abstract	13
Lista de abreviaturas e símbolos	15
Índice	17
Índice de Figuras	21
Índice de Tabelas.....	23
Introdução.....	25
1. A empresa de acolhimento e o processo de produção do CHE	25
1.1. A empresa	25
1.2. Definição e aplicação do CHE ^(1,2)	25
1.3. Matérias-primas utilizadas na produção do CHE e as suas características.....	26
1.3.1. O substrato: Amido	26
1.3.2. As Enzimas.....	27
1.4. Etapas do processo de produção do CHE.....	28
1.4.1. Preparação da pasta de cereais e gelatinização.....	30
1.4.2. Hidrólise enzimática	30
1.4.3. Pasteurização	31
1.4.4. Arrefecimento e armazenamento.....	31
1.5. Parâmetros de controlo do CHE.....	32
1.5.1. Teor de sólidos totais	32
1.5.2. Dextrose Equivalente	32
1.6. Métodos de análise para o controlo do CHE.....	33
1.6.1. Métodos rápidos de análise	34
1.6.1.1. Refratometria	35
1.6.1.2. Método eletroquímico	36
1.6.2. Método de análise de referência	37
1.6.2.1. Lane-Eynon	38
1.6.3. Novo método de análise	39
1.6.3.1. Método potenciométrico	39
2. Validação de um método analítico.....	43
2.1. Seletividade/especificidade	43
2.2. Quantificação	44

2.2.1.	Curvas de calibração.....	44
2.2.1.1.	Gama de trabalho.....	44
2.2.1.2.	Linearidade.....	45
2.2.2.	Limites analíticos.....	45
2.2.3.	Sensibilidade.....	45
2.3.	Precisão.....	46
2.4.	Robustez.....	47
2.5.	Veracidade.....	47
2.5.1.	Materiais de referência certificados.....	47
2.5.2.	Ensaio interlaboratoriais.....	48
2.5.3.	Testes comparativos.....	48
2.5.4.	Ensaio de recuperação.....	49
2.6.	Incerteza da medição.....	49
3.	Objetivos.....	51
	Procedimento experimental.....	53
4.	Métodos rápidos de análise:.....	53
4.1.	Determinação do teor de sólidos por refratometria.....	53
4.2.	Determinação da Dextrose Equivalente do CHE pelo método eletroquímico ⁽¹⁹⁾	54
4.3.	Cálculo e expressão dos resultados.....	55
4.3.1.	Determinação do fator de conversão F:.....	55
5.	Métodos de análise de referência.....	56
5.1.	Determinação do teor de sólidos pelo método de estufa.....	56
5.1.1.	Procedimento.....	56
5.1.1.1.	Preparação e pesagem das cápsulas com areia.....	56
5.1.1.2.	Pesagem das cápsulas sem areia.....	57
5.1.1.3.	Pesagem das amostras.....	57
5.1.1.4.	Secagem.....	57
5.1.2.	Cálculos.....	57
5.2.	Determinação de DE pelo método titulométrico.....	58
5.2.1.	Preparação dos reagentes.....	59
5.2.2.	Procedimento.....	59
5.2.2.1.	Pesagem das amostras.....	59
5.2.2.2.	Análise das amostras.....	60
5.2.2.3.	Ensaio em branco.....	60

5.2.2.4.	Cálculo e expressão dos resultados.....	60
6.	Novo método de análise	61
6.1.	Determinação de DE pelo método potenciométrico	61
6.1.1.	Preparação dos reagentes.....	62
6.1.2.	Preparação de amostras de ensaio e soluções	62
6.1.2.1.	Amostra de ensaio.....	62
6.1.2.2.	Preparação da solução teste	62
6.1.3.	Condições de operação	63
6.1.4.	Procedimento de operação.....	63
6.1.4.1.	Titulação das soluções de Fehling	63
6.1.4.2.	Análise da amostra	63
6.1.5.	Cálculo e expressão dos resultados	64
7.	Análise estatística dos dados ⁽⁴³⁾	65
	Resultados e Discussão	69
8.	Programação do equipamento	69
9.	Curva potenciométrica.....	71
10.	Parâmetros de validação avaliados.....	73
10.1.	Especificidade.....	74
10.2.	Precisão	74
10.2.1.	Repetibilidade de várias amostras de CHE e Farinha Láctea Simples	75
10.2.2.	Repetibilidade e precisão intermédia da amostra de referência.....	78
10.2.3.	Incerteza de medição associada à precisão	80
10.3.	Quantificação	80
10.3.1.	Limiares analíticos	82
10.4.	Veracidade e incerteza de medição	84
11.	Comparação de métodos	86
12.	Trabalhos complementares desenvolvidos na empresa.....	91
12.1.	Atualização de fatores.....	91
12.2.	Validação dos aparelhos <i>Accu-chek Performa</i>	91
12.3.	Participação nos Testes de proficiência	94
12.4.	Outros trabalhos desenvolvidos na empresa.....	95
	Conclusão	97
	Referências Bibliográficas:	99
	Anexos	103

Anexo 1.....	103
Anexo 2.....	104
Anexo 3.....	105
Anexo 4.....	106
Anexo 5.....	108
Anexo 6.....	111

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema detalhado de como os grãos de amido de batata são construídos. A - Imagem de microscópio eletrônico de grãos de amido; B – Corte transversal de um grão de amido mostrando os anéis de crescimento consistindo de regiões semi-cristalinas e amorfas; C - Detalhes da região semi-cristalina; D - Organização da molécula de amilopectina com estrutura arbórea; E - Duas moléculas de glucose com uma ligação glicosídica α -1,4 (Adaptado de: (6)).	27
Figura 2 - Representação esquemática da linha de produção do CHE: azul – preparação da pasta de cereais e gelatinização; laranja – hidrólise; verde – pasteurização; amarelo - arrefecimento e armazenamento (Adaptado de:(48)).	29
Figura 3 - Representação do desvio da luz ao trocar entre meios. i - ângulo de incidência; r – ângulo de refração (Adaptado de:(16))	35
Figura 4 - Refratômetro da marca ATAGO; modelo PAL-1; com uma faixa de medição entre 0,0 e 53,0°Brix (Adaptado de: (49)).	36
Figura 5 – Medidor de glucose da marca Accu-Chek; modelo Aviva; com uma faixa de medição entre 10-600mg/dL (Adaptado de:(22))	37
Figura 6 – Reação de Fehling (Adaptado de (26)).	38
Figura 7 – Titulador automático; marca: Radiometer; modelo: TIM 865 (Adaptado de:(30))	39
Figura 8 - Determinação do ponto de equivalência - método contínuo PI (ponto de inflexão) (Adaptado de: (44))	70
Figura 9 – A - Curva de titulação direta obtida da solução de Fehling; B - Curva da primeira derivada	71
Figura 10 – Representação gráfica da linha de regressão obtida contaminando uma amostra de CHE com 0,2, 0,3 e 0,4 g de glucose-D anidra.	81
Figura 11 - Regressão linear entre o método potenciométrico e titulométrico de Lane-Eynon	88
Figura 12 – Gráfico de dispersão de resultados obtidos pelo método potenciométrico e eletroquímico	90
Figura 13 - Gráficos com a distribuição dos pontos referentes aos valores de referência vs a diferença entre o método alternativo e de referência para o aparelho B e C.	93

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Cálculo do valor teórico de diferentes açúcares a partir do Peso Molecular (PM) e assumindo que cada composto constitui 100% da matéria seca. Os monossacarídeos redutores estão destacados a vermelho. (Adaptado de: (19)).	33
Tabela 2 – Lista de reagentes e materiais utilizados para a determinação do teor de sólidos pelo método de estufa.	56
Tabela 3 - Aliquota a ser escolhida de acordo com o tipo de amostra, a sua matéria seca e dextrose equivalente esperada.	62
Tabela 4 - Condições gerais de operação do equipamento tal como estão descritas no titulador. (Alguma informação foi retirada por questões de confidencialidade)	69
Tabela 5 – Resultados de repetibilidade obtidos para o CHE.	76
Tabela 6 – Resultados de repetibilidade obtidos para a Farinha Láctea Simples	77
Tabela 7 – Resultados de repetibilidade referentes à amostra de referência de 2016.	79
Tabela 8 – Resultados referentes aos ensaios da precisão intermédia para a amostra de referência BFF-2 2016	79
Tabela 9 - Valores médios de TS e DE obtidos pelo método potenciométrico a partir de amostras de CHE contaminadas com 0,2, 0,3, 0,4 g de glucose D-anidra;	81
Tabela 10 – Estimativa de açúcares superiores à glucose, que poderão estar presentes no CHE	82
Tabela 11 – Resultados referentes ao cálculo de LD e LQ.	83
Tabela 12 – Valores certificados dos açúcares para a amostra de referência BFF-2 2016.	84
Tabela 13 – Resultados relativos à veracidade e à incerteza do MRC.	85
Tabela 14 - Análise comparativa dos resultados de DE obtidos para o método potenciométrico e para o método titulométrico de Lane-Eynon para amostras de CHE.	87
Tabela 15 - Análise comparativa dos resultados de DE obtidos para o método potenciométrico e para o método eletroquímico para amostras de CHE.	89
Tabela 16 – Fatores de conversão obtidos para: (A) - <i>Accu-chek Aviva</i> , (B) - <i>Accu-chek performa e</i> (C) - <i>Accu-chek Performa</i> .	92
Tabela 17 - Critérios de validação para a análise de diferenças (diferenças sistemáticas).	93
Tabela 18 – Valores de DE para a Farinha BTP	104
Tabela 19 - Resultados das análises de DE para a amostra de referência de 2016, realizadas em condições de reprodutibilidade intermédia.	105
Tabela 20 - Valor médio de teor de sólidos obtidos para o método refratométrico e para o método de estufa.	106

Tabela 21 – Resultados obtidos de TS, DE por potenciometria e leituras (R) médias de cada Accu-chek para as 20 amostras de CHE para determinação do fator de conversão	108
Tabela 22 – Resultados de DE obtidos pelo método de referência (R) e pelos aparelhos Accu-chek das 20 amostras; diferenças obtidas entre o método de referência e cada aparelho.....	109
Tabela 23 - Resultados de DE de 10 amostras de CHE obtidos pelo método de referência (R) e pelos aparelhos Accu-chek (B e C); diferenças obtidas entre o método de referência e cada aparelho. .	110
Tabela 24 – Resultados de DE referentes à amostra de Referência BFF – 1 2017;	111
Tabela 25 - Resultados de DE referentes à amostra de Referência BFF – 2 2017;.....	111

Introdução

1. A empresa de acolhimento e o processo de produção do CHE

1.1. A empresa

A Fábrica de Avanca da Nestlé Portugal, S.A. é uma empresa do setor alimentar que faz parte do grupo multinacional suíço Nestlé. A Nestlé iniciou a sua atividade comercial, em Portugal, nos finais do século XIX, mas foi só em 1933 com a aquisição da sociedade de produtos lácteos, empresa fundada pelo Nobel da Medicina, Prof. Egas Moniz, que iniciou a sua atividade industrial, no lugar onde hoje é a fábrica de Avanca. O foco desta empresa passa pela produção de produtos alimentares designados: farinhas infantis, cereais de pequeno-almoço, produtos solúveis com e sem café, leite em pó aglomerado, produtos de base mistura a seco e natas refrigeradas.

1.2. Definição e aplicação do CHE ^(1,2)

O processo produtivo de alguns produtos, referidos anteriormente, passam inicialmente pela produção de uma pré-mistura designada de CHE (Cereais Hidrolisados Enzimaticamente). O princípio do processo de produção do CHE consiste na quebra enzimática do amido em moléculas mais pequenas, utilizando farinhas de cereais como fonte de amido e enzimas para catalisar a hidrólise. O CHE é usado principalmente como um ingrediente na sua forma líquida, em produtos à base de cereais secos em rolos de secagem, tais como:

- Cereais infantis, incluindo refeições e sobremesas infantis;
- Cereais liquidificados, bebida de cereais;
- Produtos culinários à base de cereais, como comidas para bebés e sopas infantis.

O CHE tem a capacidade de influenciar as propriedades do produto em diversos aspetos, nomeadamente:

- Diminuição da viscosidade em comparação a cereais que não são sujeitos a hidrólise, obtendo-se diferentes texturas no produto final. A diminuição da viscosidade leva, por sua vez, ao aumento do teor de sólidos nas sopas antes da secagem, o que permite aumentar a saída nos tubos e aumentar a velocidade de secagem;
- Melhor molhabilidade de produtos, havendo menor tendência para a formação de grumos;

- A solubilização parcial do amido permite uma maior facilidade na digestão, o que é especialmente importante nas crianças, assim como na formação de hidratos de carbono com baixo peso molecular, que são de natureza doce e permitem a substituição parcial ou total da sacarose;
- Melhor formação do filme nos rolos de secagem para produtos de difícil secagem (ex: Nestum arroz);
- Como o nível de proteínas no produto acabado é geralmente fixo (CODEX *alimentarius* ou legislação local) e o CHE contém proteínas, a quantidade de leite na fórmula pode ser reduzida, o que influencia favoravelmente os custos;
- Produtos que têm na sua constituição o CHE tem tendência para aglomerar a uma humidade mais baixa do que produtos sem CHE. Isto deve ser considerado na escolha do material da embalagem;
- O CHE tem uma boa retenção de sabores pelo que pode ser usado na secagem por pulverização como suporte para aromas, fruta, mel, etc.

1.3. Matérias-primas utilizadas na produção do CHE e as suas características

1.3.1. O substrato: Amido

Cereais e produtos à base de cereais são uma importante fonte de energia, hidratos de carbono, proteínas e fibras para o ser humano. O amido é o composto mais abundante nos cereais constituindo cerca de 77-87% da matéria seca (3,4). O amido é um polissacarídeo constituído por duas macromoléculas diferentes, a amilose e a amilopectina, que são ambas polímeros de glucose e estão organizados em grãos, cujo tamanho, depende da origem botânica. A amilose é um polímero linear, onde as unidades de glucose estão ligadas por ligações glicosídicas α -1,4. Por outro lado, a amilopectina é um polímero ramificado com pequenas cadeias lineares de glucose ligadas em α -1,4 e com cadeias laterais α -1,6 (5).

Os grãos de amido estão organizadas em regiões amorfas e cristalinas como se pode observar na Figura 1. No amido dos cereais, a amilopectina é o componente mais importante da região cristalina. Já a amilose está complexada com os lípidos formando uma fraca estrutura cristalina (região amorfa).

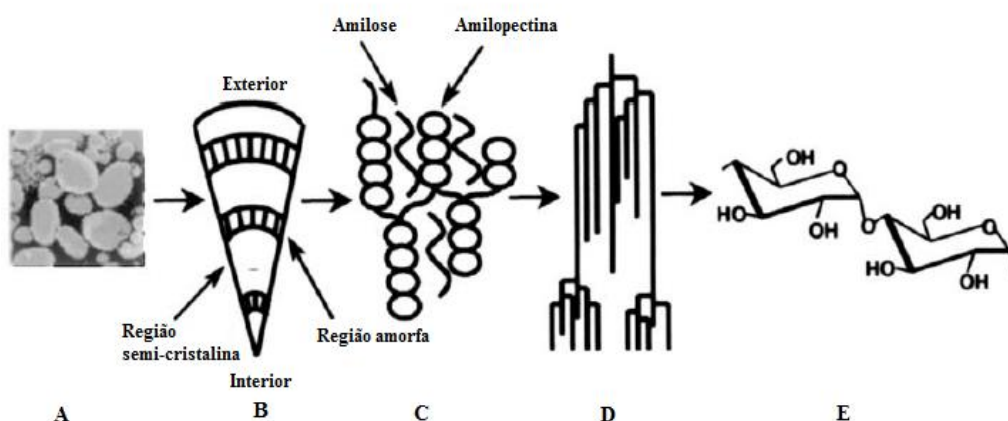


Figura 1 – Esquema detalhado de como os grãos de amido de batata são construídos. **A** - Imagem de microscópio eletrônico de grãos de amido; **B** – Corte transversal de um grão de amido mostrando os anéis de crescimento consistindo de regiões semi-cristalinas e amorfas; **C** - Detalhes da região semi-cristalina; **D** - Organização da molécula de amilopectina com estrutura arbórea; **E** - Duas moléculas de glucose com uma ligação glicosídica α -1,4 (Adaptado de: (6)).

Desta forma, enquanto a amilopectina é solúvel em água, a amilose e o próprio grão de amido são insolúveis em água fria (6,7). Assim, durante o processo industrial de hidrólise do amido, a pasta de água/amido tem de ser submetida a um aquecimento, para que os grãos inchem até atingir um ponto em que esta expansão é irreversível. Este processo de inchamento é denominado de gelatinização e permite que a amilose seja libertada para fora do grão, provocando, conseqüentemente, um aumento da viscosidade na suspensão (6). Por conseguinte, no amido gelatinizado, torna-se mais fácil para as amilases atuarem sobre ele por estar mais exposto às enzimas, do que nos grãos de amido cru (8).

1.3.2. As Enzimas

As enzimas têm vindo a ser reconhecidas como uma ferramenta útil no melhoramento de processos de produção e/ou nas propriedades de alimentos à base de cereais. As amilases estão entre as enzimas mais importantes, constituindo uma classe de enzimas industriais com aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas (9). Podem ser obtidas a partir de diversas fontes, tais como plantas, animais e microrganismos. Atualmente, um grande número de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e substituíram praticamente a hidrólise química do amido na indústria de processamento de amido. As principais vantagens da utilização de microrganismos para a produção de amilases é a capacidade de produção em massa, de forma económica e o fato dos microrganismos serem fáceis de manipular para a obtenção de enzimas com características desejadas (10). Estas

enzimas têm um amplo espectro de aplicações industriais, nomeadamente na indústria alimentar, têxtil, de detergentes e farmacêutica (11).

As amilases podem ser divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. A α -amilase pertence à família das endoamilases que catalisam a hidrólise, de forma aleatória, no interior da molécula de amido, através da clivagem as ligações α -1,4 (5). A α -amilase utilizada na produção do CHE é produzida por fermentação submersa proveniente do microrganismo *Bacillus amyloliquefaciens* (12). Já as exoamilases hidrolisam sequencialmente as ligações α -1,4, a partir da extremidade não redutora, resultando sucessivamente em produtos finais curtos. Estas enzimas, também têm a capacidade de hidrolisar as ligações α -1,6 formando maioritariamente glucose (5). Nesta categoria encontra-se a enzima amiloglucosidase, uma enzima também utilizada na produção do CHE e que também é produzida por fermentação submersa a partir do *Aspergillus niger* (12).

A atividade das enzimas é influenciada por vários fatores nomeadamente: temperatura, pH, a presença de cálcio, substratos, etc. A temperatura ótima para a atividade tanto da α -amilase, como da amiloglucosidase está relacionada, principalmente com o crescimento dos microrganismos (crescimento inibido acima dos 66°C). As α -amilases são geralmente estáveis numa ampla gama de pH de 4 a 11 (9). Já as amiloglucosidases são geralmente ativas entre o meio ácido e neutro, com valores de pH ótimos de cerca de 4,5-5,0. No entanto, os valores ótimos de pH, por vezes, não são aplicados por razões práticas e nutricionais. Relativamente ao cálcio, as enzimas, apresentam maior estabilidade quando este ião está presente, principalmente a α -amilase. Esta enzima é uma metaloenzima, ou seja, contem na sua estrutura um ou mais iões de cálcio. Desta forma, na presença de cálcio, esta enzima aparenta ser mais termoestável, do que na sua ausência. Já a amiloglucosidase, do *Aspergillus niger* não sofre nenhuma interferência pela ação do ião de cálcio. Assim, em alguns casos, não há necessidade de se adicionar cálcio, uma vez que o conteúdo natural deste ião na água está acima da exigência mínima das enzimas (2,9,10,13).

1.4. Etapas do processo de produção do CHE

O processo do CHE passa por 4 principais etapas: preparação da pasta de cereais e gelatinização, hidrólise enzimática, pasteurização e arrefecimento e armazenamento. A figura 2, abaixo apresentada, esquematiza a linha de produção do CHE.

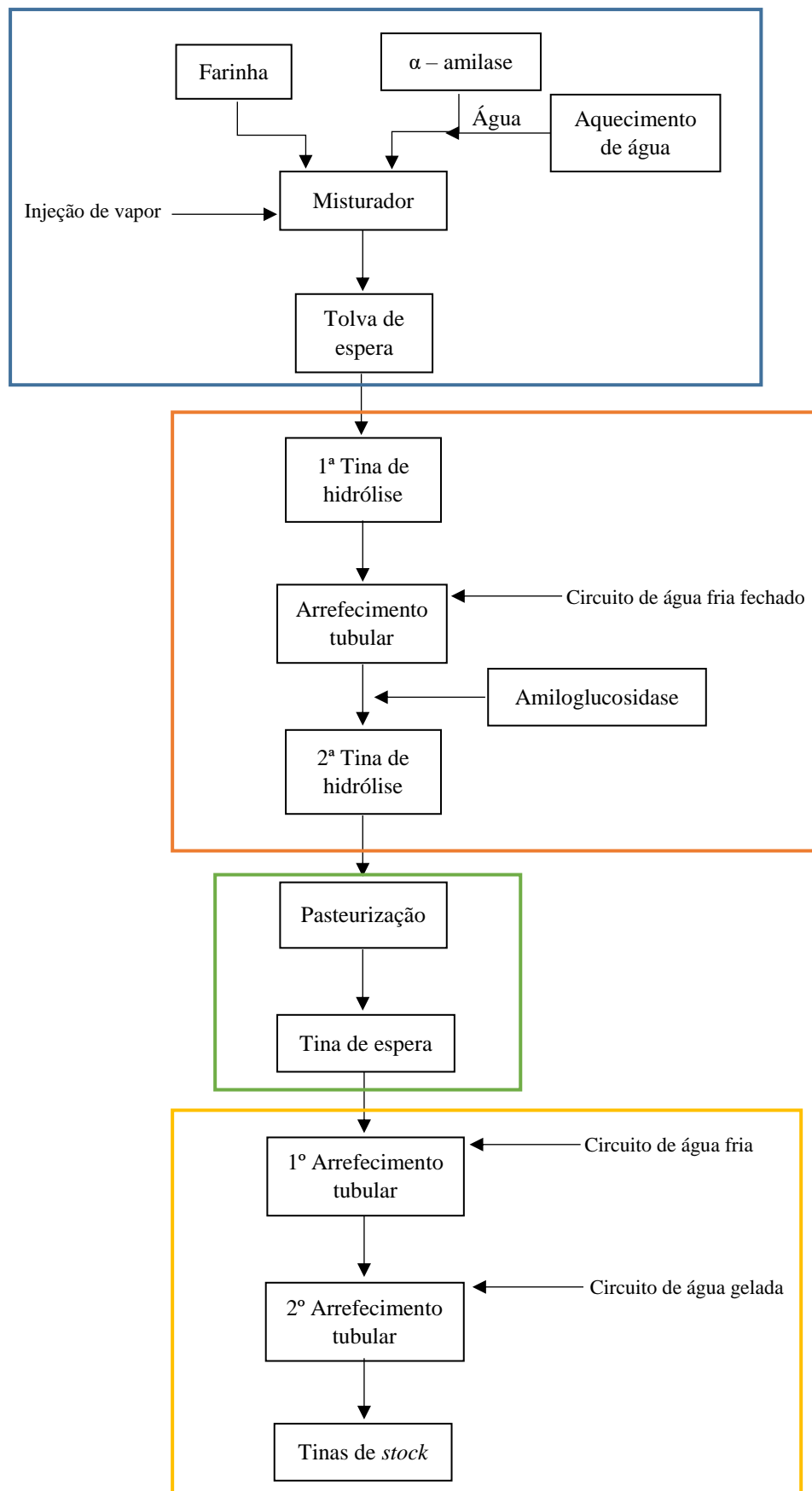


Figura 2 - Representação esquemática da linha de produção do CHE: azul – preparação da pasta de cereais e gelatinização; laranja – hidrólise; verde – pasteurização; amarelo - arrefecimento e armazenamento (Adaptado de:(48))

1.4.1. Preparação da pasta de cereais e gelatinização

Tal como representado na Figura 2, o processo do CHE inicia-se com a preparação de uma pasta de cereais onde as matérias-primas, farinha e enzima, são primeiramente doseadas e, de seguida, misturadas com água quente. Nesta etapa pretende-se ter as condições necessárias para uma hidrólise otimizada, desta forma, a água quente e a injeção de vapor permite que o amido seja gelatinizado. Este passo é fundamental pois como já foi referido anteriormente, nos grãos de amido, a amilose e a amilopectina estão densamente empacotadas num estado semi-cristalino com ligações inter e intramoleculares que são insolúveis em água fria e são muitas das vezes resistentes a químicos e a enzimas. Assim, a água quente e o vapor leva a uma quebra física dos grãos abrindo a estrutura cristalina para a posterior ação da enzima (14).

O vapor injetado no misturador, onde se encontra a pasta, também tem como objetivos pasteurizar a pasta de modo a eliminar os microrganismos da farinha e inativar as enzimas, naturalmente presentes na farinha, que desempenham um papel fundamental na germinação e maturação das sementes (5). Como as temperaturas de pasteurização são elevadas, a pasta fica numa tolva de espera para criar tempo de residência até atingir as condições necessárias para a primeira hidrólise (2).

1.4.2. Hidrólise enzimática

Segundo Robertson *et al.*, o processo de gelatinização leva ao aumento da viscosidade até 20 vezes mais, o que dificulta posteriormente a mistura e o bombeamento (15). A primeira hidrólise pretende, assim reduzir a viscosidade da suspensão, resultante da gelatinização e aumentar a sua solubilidade. Para tal, a enzima utilizada é a α -amilase, uma enzima que também é designada de “liquidificadora”. Como já foi referido, esta catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a uma temperatura e tempo controlados, dando origem a dextrinas com diferentes comprimentos e a moléculas com baixo peso molecular como glucose, maltose e maltotriose (11).

Como a α -amilase está restrita às ligações α -1,4, as ligações ramificadas α -1,6 da cadeia de amilopectina não são atacadas. Deste modo, na segunda hidrólise é adicionada a amiloglucosidase, que irá atacar para além das ligações α -1,4 também as ligações glicosídicas α -1,6. Esta enzima é responsável pela sacarificação do produto que tem como principal efeito produzir glucose, de modo a conferir doçura ao produto final. De salientar

ainda, que entre a primeira e a segunda hidrólise, o produto passa por um arrefecimento tubular com água fria (circuito fechado) para baixar a temperatura resultante da primeira hidrólise, de modo a que a segunda hidrólise seja realizada a uma temperatura adequada para a atividade ótima da amiloglucosidase (2).

1.4.3. Pasteurização

Após a hidrólise, o CHE passa por um segundo processo de pasteurização por injeção direta de vapor, onde são usadas temperaturas muito altas. Os principais objetivos desta pasteurização são inativar as enzimas que foram utilizadas durante o processo de hidrólise e eventualmente eliminar alguns microrganismos patogénicos. Este passo é particularmente fundamental, quando o CHE é misturado com farinha que não foi hidrolisada, por exemplo em misturadores antes dos rolos de secagem. Caso as enzimas ainda estivessem ativas, estas iriam reagir com a farinha por hidrolisar levando a alterações na viscosidade do produto. Após a pasteurização, o CHE é encaminhado para uma tina que irá remover o vapor, à pressão atmosférica, que foi injetado previamente no CHE, baixando desta forma a temperatura do produto (2).

1.4.4. Arrefecimento e armazenamento

Por fim, o CHE passa por dois circuitos fechados, um com água fria e outro com água gelada para um arrefecimento final necessário para baixar a temperatura do CHE. O CHE é armazenado em tanques de armazenamento refrigerados com água gelada para manter a temperatura do produto abaixo da temperatura de risco de crescimento biológico. A fase de armazenamento nos tanques de *stock* constitui um ponto crítico de controlo no plano HACCP (do inglês, *Hazard Analysis and Critical Control Point*) da linha de produção, pela possibilidade de ocorrer contaminação do produto com toxinas produzidas por microrganismos que não foram eliminados pela pasteurização. Sendo assim, o tempo e a temperatura de armazenamento são controlados através de sondas.

É também durante esta fase que são realizadas algumas análises físico-químicas em linha, sendo que os parâmetros avaliados incluem o teor de sólidos totais, a dextrose equivalente (DE) e a viscosidade. Caso os parâmetros estejam dentro dos limites de controlo, as bombas enviam o CHE para o misturador onde se adicionam outros ingredientes para obtenção de diferentes produtos.

1.5. Parâmetros de controlo do CHE

1.5.1. Teor de sólidos totais

Como já foi referido anteriormente, o teor de sólidos totais constitui um dos parâmetros de controlo na produção do CHE. A determinação deste parâmetro permite avaliar a extensão de hidrólise do CHE e assegurar que tenha uma viscosidade adequada para a saída nos rolos de secagem. O teor de humidade (ou teor de sólidos totais) dos alimentos é um fator importante na qualidade dos alimentos, conservação e resistência à deterioração. A determinação do teor de humidade é também necessária para calcular o teor de outros constituintes de alimentos, isto é, hidratos de carbono, gorduras, proteínas, vitaminas e minerais, numa base uniforme (isto é, base em peso seco). Desta forma, o teor de sólidos é, por definição, a matéria seca que permanece após a secagem do produto (16).

1.5.2. Dextrose Equivalente

A DE constitui um outro parâmetro de extrema importância no processo do CHE, pois permite caracterizar a extensão da hidrólise do amido, de forma a assegurar a qualidade e a consistência do produto final. Por exemplo, a solubilidade, a doçura, a higroscopicidade e a compressibilidade aumentam com o aumento da DE, enquanto que a viscosidade e a inibição da cristalização de xaropes diminuem à medida que a DE aumenta (17).

A DE é baseada na determinação de açúcares redutores presentes numa amostra e é expresso em gramas de D-glucose por 100 g de matéria seca. Isto significa que os grupos redutores dos mono e oligossacarídeos, tais como a glucose, maltose e malto dextrinas são expressos como “equivalente de glucose” ou geralmente designado de “equivalente de dextrose”(18).

Os diferentes níveis de hidrólise do CHE podem ser classificados do seguinte modo:








- **DE baixo:** 5-10
- **DE médio:** 25-35
- **DE alto:** 50-65

A DE que se pretende obter depende das condições que são usadas durante a hidrólise, sendo necessário ajustar o tempo e a quantidade de enzima de sacarificação. Para a obtenção

de uma DE=10 apenas é adicionado a α -amilase, numa DE superior a 10, para além da α -amilase também é adicionado a enzima de sacarificação, a amiloglicosidase.

Assumindo que cada composto está presente na sua forma pura e constituem 100% da matéria seca, o valor teórico da DE pode ser calculada a partir do peso molecular. Desta forma, a glucose pura tem uma DE = 100, no entanto o amido tem uma DE = 0. Isto é, conforme o comprimento da cadeia fica mais longa a DE diminui, uma vez que só o açúcar terminal redutor é que é medido pelo método de açúcares redutores. Assim, quanto maior for a hidrólise, maior será o valor da DE (Tabela 1) (18,19).

Tabela 1 – Cálculo do valor teórico de diferentes açúcares a partir do Peso Molecular (PM) e assumindo que cada composto constitui 100% da matéria seca. Os monossacarídeos redutores estão destacados a vermelho. (Adaptado de: (19)).

Estrutura	PM (g/mol)	DE* (g/100g)
 glucose	180	$\frac{180}{180} \times 100 = 100$
 maltose	342	$\frac{180}{342} \times 100 = 53$
 maltotriose	504	$\frac{180}{504} \times 100 = 36$
 maltotetraose	666	$\frac{180}{666} \times 100 = 27$
 maltopentose	828	$\frac{180}{828} \times 100 = 22$
 maltohexaose	990	$\frac{180}{990} \times 100 = 18$
 maltoheptose	1152	$\frac{180}{1152} \times 100 = 15$

1.6. Métodos de análise para o controlo do CHE

São vários os métodos que têm sido desenvolvidos que permitem determinar o valor de DE em amido hidrolisado. Entre os vários métodos quantitativos disponíveis para a determinação de açúcares redutores está o método titulométrico de Lane-Eynon, também conhecido como método de Fehling. Tanto este método, como o método de estufa, para

determinação do teor de sólidos, são utilizados como métodos de referência no laboratório Físico-Químico do Departamento de Garantia de Qualidade. Por serem métodos morosos, a existência de metodologias de análise passíveis de ser utilizadas na linha de produção são uma mais-valia. Desta forma, são utilizadas dois métodos próximos da linha de produção do CHE: método refratométrico e o método eletroquímico que consiste de um medidor de glicémia. Estes permitem efetuar análises rápidas ao produto e atuar mais rapidamente, quando o processo está fora de controlo, garantindo assim, a conformidade dos produtos finais e prevenindo de forma precoce, o reprocessamento de grandes quantidades de produto. Porém, o controlo por estes métodos requer uma confirmação periódica com o método de referência.

Assim, a implementação de metodologias analíticas alternativas capazes de responder de forma rápida e precisa permite, deste modo, diminuir o tempo de análise e controlar melhor o processo de produção. Desta forma, surgiu a possibilidade de implementar um novo método de referência no laboratório Físico-Químico do Departamento de Garantia de Qualidade, que permitirá obter de forma relativamente rápida resultados precisos. Os próximos subcapítulos evidenciam os princípios teóricos de cada um dos métodos utilizados para o controlo do CHE.

1.6.1. Métodos rápidos de análise

O refratómetro e o medidor de glucose manual são os dois aparelhos que se encontram na linha de fabricação do CHE e que possuem características fundamentais que facilitam o controlo rápido do CHE. Para além de permitirem a análise de teor de sólidos totais e DE, respetivamente, em apenas alguns segundos, estas tecnologias apresentam inúmeras vantagens quando comparadas com outras mais tradicionais. De entre as vantagens pode-se destacar:

- São tecnologias rápidas, fiáveis e que originam resultados valiosos no controlo rápido do processo;
- São métodos “amigos do ambiente”, isto é, não geram resíduos tóxicos durante a sua execução;
- Não consomem reagentes;
- Exigem pouca ou nenhuma preparação das amostras;

- Podem ser colocadas na linha de produção e serem manuseadas por pessoal não qualificado para executar análises químicas, requerendo somente uma formação básica.

1.6.1.1. Refratometria

A refratometria constitui um método físico, não seletivo que permite medir a quantidade de sólidos totais presentes numa amostra, sem fazer distinção entre os tipos de açúcares presentes e as suas concentrações. É um instrumento ótico simples que se baseia no princípio físico da refração da luz, que consiste na mudança da direção de um feixe de luz ao trocar de meio. A amostra a ser medida é colocada no prisma do aparelho onde é incidido uma luz. O refratômetro irá, assim medir o ângulo de refração, que corresponde ao índice de refração, resultante do desvio da luz, quando esta incide no prisma com a amostra. De salientar que o índice de refração varia de acordo com a concentração do composto, temperatura e comprimento de onda da luz (16). A Figura 3 ilustra como o raio incidente se desvia ao trocar de meio, resultando no princípio utilizado pela refratometria.

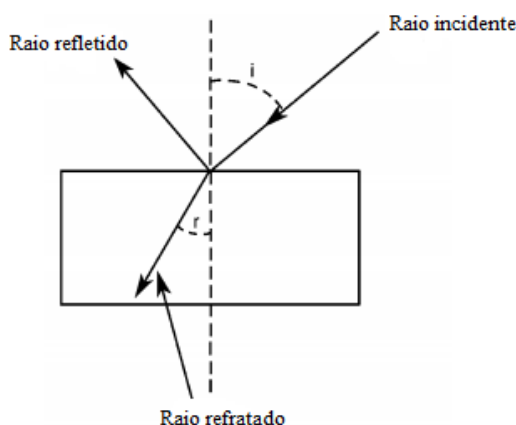


Figura 3 - Representação do desvio da luz ao trocar entre meios. *i*- ângulo de incidência; *r* – ângulo de refração (Adaptado de:(16))

A unidade utilizada é o grau Brix (°Brix) que representa 1g de compostos solúveis totais a cada 100g de solução. Assim sendo, uma solução de 100g de água e sacarose, contendo 20g de sacarose, é uma solução de 20°Brix. A Figura 4 ilustra o refratômetro utilizado próximo da linha de produção do CHE para a monitorização do teor de sólidos no produto (18).



Figura 4 - Refratômetro da marca ATAGO; modelo PAL-1; com uma faixa de medição entre 0,0 e 53,0°Brix (Adaptado de: (49)).

Esta metodologia é comumente utilizada, nomeadamente em linhas de produção para monitorizar o índice de refração de produtos, como refrigerantes. Para além disso, também demonstra ser um método preciso, tal como foi verificado num estudo realizado por Caldas *et al.* onde utilizaram um refratômetro digital igual ao utilizado na linha do CHE, para a determinação de açúcares em néctar e em sumos concentrado de uva. Este aparelho foi comparado com a espectrofotometria e a cromatografia líquida. Os resultados do estudo indicam que a menor variação de resultados foi observada pela refratometria (20). Assim, este estudo mostra que a refratometria apresenta ser uma técnica apropriada para medidas rotineiras, considerando a sua precisão, facilidade e simplicidade de uso.

1.6.1.2. Método eletroquímico

O método eletroquímico utilizado consiste de um pequeno diapositivo médico concebido para medir a concentração de glucose no sangue (Figura 5). No entanto, também pode ser aplicado para determinar a concentração de glucose em produtos submetidos ao processo do CHE (19). A enzima presente nas tiras, a glucose desidrogenase, converte a glucose na amostra em gluconolactona, libertando dois eletrões que irão reagir com a coenzima (PQQ – Piroloquinolina quinona), aceitadora de eletrões. Esta reação gera um sinal de corrente contínua que é proporcional à concentração de glucose (21,22).



Figura 5 – Medidor de glucose da marca Accu-Chek; modelo Aviva; com uma faixa de medição entre 10-600mg/dL (Adaptado de:(22))

A utilização deste dispositivo, na indústria alimentar, já foi feita anteriormente, em 1993, por Coleman *et al.* para monitorizar a qualidade de tubérculos de batata armazenados. Neste estudo os investigadores determinaram a glucose em extratos de batata utilizando o medidor de glicémia e o analisador bioquímico para comparação de resultados. Os resultados do medidor de glucose foram semelhantes aos resultados obtidos a partir do analisador. Os investigadores concluíram que o medidor forneceu um perfil rápido, preciso e quantitativo da qualidade dos tubérculos armazenados (23).

Assim, pode-se concluir que esta metodologia constitui um método rápido para a determinação quantitativa de DE no CHE, permitindo ser usado próximo da linha de produção por ser um instrumento portátil e de fácil utilização.

1.6.2. Método de análise de referência

Como já foi referido anteriormente, apesar das metodologias utilizadas em linha de produção constituírem de aparelhos simples e de fácil manuseamento requerem, frequentemente, correlação com métodos menos empíricos. Desta forma, a metodologia Lane-Eynon é o método titulométrico de referência usado no laboratório para determinação de açúcares redutores nas amostras de CHE.

1.6.2.1. Lane-Eynon

A titulação é uma análise química quantitativa onde o titulante, com uma concentração conhecida, reage com a substância a ser determinada. O princípio básico da titulação de Lane-Eynon consiste numa reação oxidação-redução em que há transferência direta de elétrons de uma espécie para outra. Neste caso, ocorre a redução completa do óxido de cobre (II) do reagente de Fehling (uma solução de sulfato de cobre com tartarato duplo de sódio e potássio) a óxido de cobre (I), causada pelos aldeídos dos açúcares redutores, ficando estes, pelo contrário, oxidados. A solução inicial é azul devido ao óxido de cobre (II) e torna-se avermelhada devido à formação do óxido de cobre (I) (Cu_2O) durante o aquecimento. A quantidade de óxido de cobre (I) formado é diretamente proporcional ao DE. Por conseguinte, o excesso de óxido de cobre (II) que ficou por reagir irá ser completamente convertido em iodeto de cobre (CuI), com libertação de uma quantidade equivalente de iodo (I). O iodo formado a partir de iodeto é determinado por titulação com tiosulfato (Figura 6). O ponto final da titulação é detetado visualmente usando um indicador (amido) que muda de cor (para incolor), assim que toda a substância contida na amostra tiver reagido com o titulante adicionado (24–26).

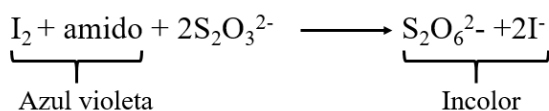
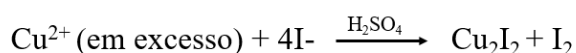


Figura 6 – Reação de Fehling (Adaptado de (26)).

Segundo Delheye *et al.* (24) o método de Lane-Eynon apresenta uma boa precisão e reprodutibilidade, no entanto é um método muito moroso. De forma a atingir resultados exatos é necessário manter a ebulição constante para evitar que o óxido de cobre (I) (de coloração avermelhada) seja oxidado pelo oxigênio presente no ar e volte a óxido de cobre (II) (de coloração azul) (24).

Em muitos laboratórios, o método de Lane-Eynon continua a ser o método mais comumente utilizado na determinação de açúcares redutores. Contudo, é um método que requer a deteção visual do ponto de equivalência, o que pode se tornar numa tarefa difícil, principalmente quando são utilizadas soluções de cor escura. Além disto, é um método que

apresenta outras desvantagens, nomeadamente é um método que consome uma grande quantidade de reagentes, requer um tempo preciso e a leitura do ponto final da titulação é relativamente grosseira e depende da sensibilidade e da prática do analista. De forma a superar este problema, surgiu a necessidade de desenvolver um método mais fácil e confiável para a determinação do ponto final (27,28).

1.6.3. Novo método de análise

1.6.3.1. Método potenciométrico

A titulação potenciométrica, é um método que deteta a diferença de potencial entre o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência e, desta forma, determina a concentração do componente químico que reage com o reagente adicionado a uma solução potencialmente em equilíbrio no início. O método que se pretende implementar é, segundo a instrução interna laboratorial para a determinação de DE no CHE, baseado no princípio de Lane-Eynon e na ISO 5377:1981 (29). À semelhança do método de Lane-Eynon este método consiste em titular um volume conhecido de solução de Fehling, mantida no ponto de ebulição, mas com uma solução padrão de glucose. Em condições idênticas, procede-se à titulação do mesmo volume de solução de Fehling mas com a adição da amostra a ser analisada. O cálculo do teor de açúcares redutores é feito por comparação dos valores obtidos nas duas titulações. Esta titulação baseia-se no mesmo princípio do método titulométrico de Lane & Eynon só que ao invés de ser realizada manualmente, como no método tradicional, é realizada com um titulador automático.

Os eléctrodos que são utilizados para a deteção do ponto de equivalência são um eléctrodo de platina e um eléctrodo de vidro de pH de referência que estão conectados a um titulador automático TIM 865 (Figura 7).



Figura 7 – Titulador automático; marca: Radiometer; modelo: TIM 865 (Adaptado de:(30))

O titulador TIM 865 é um aparelho que permite traçar uma curva de titulação através do potencial (E) medido pelo eletrodo indicador em função do volume de reagente adicionado. O sistema de adição do titulante (através de uma bureta), permite controlar a velocidade à qual o reagente é adicionado, de acordo com a resposta do eletrodo indicador. As curvas de titulação são tratadas matematicamente de forma segura e armazenadas na memória do titulador para futuras observações (30). Desta forma, este método mostra ser uma alternativa promissora e que permite ultrapassar as limitações da titulação manual, que já foram referidas anteriormente.

Com isso em mente, já foram vários os investigadores (27,31,32) que realizaram estudos para a determinação potenciométrica de açúcares. Papastathopoulos *et al.* (31) realizou um estudo onde utilizou um eletrodo seletivo de iões de cobre para determinar açúcares redutores em amostras tratadas com reagente de Stanley-Benedict. Foram determinadas concentrações de glucose na gama de 0,5-2 mg com um erro médio de cerca de 2%. Os estudos de recuperação realizados em amostras de mel, marmelada e sumos de fruta mostraram uma recuperação de 99-106% e uma boa concordância com os métodos oficiais.

Em 1981, Noakes *et al.* (32) usou um eletrodo de platina (Pt) acoplado a um eletrodo de calomelano saturado, incorporado com uma ponte de sal, para a deteção potenciométrica do ponto final do método de Lane-Eynon em amostras de sumo. Os resultados do estudo demonstram que o método é capaz de estimar de forma precisa a percentagem de açúcares redutores em amostras de sumo, através da obtenção de curvas de titulação com um ponto de inflexão a ~551 mV. Da mesma forma, Alexander *et al.* (27) realizaram um estudo onde compararam vários eletrodos para a deteção do ponto final, numa titulação potenciométrica automática, para a determinação de açúcares redutores em amostras. Foram utilizados eletrodos indicadores de cobre e platina e eletrodos de referência de calomelano saturado e prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Os resultados demonstram que os eletrodos medem com precisão o ponto final da titulação, variando entre 18 e 220 mV e desvios padrões relativos entre 0,44 e 0,67 % para a precisão dos volumes. A combinação de eletrodos que demonstrou maior precisão foi a combinação Cu-Pt. Para além disso, realizaram uma regressão linear correlacionando a titulação potenciométrica e o método de Lane-Eynon, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,9960.

Em suma, os resultados reportados nos estudos (27,31,32) indicam que a titulação potenciométrica apresenta vantagens relativamente ao método tradicional de Lane-Eynon, na medida em que se obtiveram resultados precisos sem a necessidade de deteção visual da mudança de cor na solução, no ponto final da titulação e é uma forma mais expedita de processar a análise.

2. Validação de um método analítico

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem, através da Validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida (33).

A definição de validação segundo a ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*) 17025:2005 é dada como: “a confirmação através de análises e do fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos para um uso específico pretendido são cumpridos”(34). Segundo a interpretação de Thompson *et al.*(35) a validação de um método consiste em investigar se o propósito da análise do método é alcançado, através da obtenção de resultados analíticos fiáveis e com um nível de incerteza aceitável. Desta forma, a validação de um método analítico constitui o primeiro nível da garantia da qualidade no laboratório (35,36).

Na prática, a validação do método é feita avaliando uma série de características de desempenho do método, tais como: seletividade/especificidade, linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de deteção (LD), precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e reprodutividade intermedia), robustez, veracidade e incerteza de medição (35).

A implementação do método, em questão, segue as diretrizes do guia interno da Nestlé sobre validação e verificação de métodos químicos (37). De seguida, serão abordados, de forma sumária, cada um dos parâmetros de validação e apresentados os critérios internos da Nestlé de aceitação que terão de ser considerados para a avaliação dos parâmetros de validação.

2.1. Seletividade/especificidade

Uma amostra, de maneira geral, é constituída por compostos que se pretendem quantificar, designados de analitos, e por outros componentes que podem ter algum efeito na determinação, mas cujo objetivo não é a sua quantificação, sendo por isso designados por interferentes (38). De acordo com Eurachem (39), a especificidade e a seletividade refletem essencialmente a mesma característica e estão estreitamente relacionadas entre si, de tal

modo, que a especificidade significa 100% de seletividade (39). A seletividade pode ser definida como a capacidade de um método em distinguir os diferentes componentes de uma mistura complexa. Por outro lado, um método é específico quando permite discriminar o analito de interesse relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito de interesse (33,36). Seletividade e especificidade são desta forma, medidas que avaliam a confiabilidade das medições na presença de interferências (39).

2.2. Quantificação

Para interpretar as informações transmitidas pelos estudos e ensaios efetuados, é necessário o cálculo de vários parâmetros, nomeadamente, as curvas de calibração, os limiares analíticos do método de ensaio e a sensibilidade (33).

2.2.1. Curvas de calibração

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida (33). Uma curva de calibração deve basear-se em pelo menos cinco pontos experimentais e um branco, que enquadrem o intervalo de concentração da maior parte das amostras que normalmente são ensaiadas. Sendo que o primeiro ponto da curva deve ter uma concentração idêntica ou próxima do limite de quantificação (LQ). Efetua-se o cálculo dos parâmetros da curva, declive ou inclinação e ordenada na origem, a partir dos pontos experimentais, obtendo-se uma reta (33,40).

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = a + bx$$

Em que a representa a ordenada na origem e b o declive da reta.

2.2.1.1. Gama de trabalho

Para qualquer método analítico existe uma gama de trabalho, isto é, uma faixa de concentrações do analito, para a qual o método em causa pode ser aplicado. No limite inferior da gama de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ). No limite superior, os fatores limitantes dependem da capacidade de

resposta do equipamento de medição. Dentro da gama de trabalho pode existir uma resposta linear e, dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito (38).

2.2.1.2. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade para, dentro de um determinado intervalo, obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (41). A linearidade é, assim, obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinada numa amostra real (38).

A relação linear deve ser avaliada em toda a gama do procedimento analítico e recomenda-se um mínimo de cinco concentrações para o estabelecimento da linearidade (41).

É importante que uma curva de calibração linear seja repetível de dia para dia, no entanto, gamas lineares podem ser diferentes para diferentes matrizes, devido ao efeito de interferências inerentes à matriz (36).

2.2.2. Limiares analíticos

Os limiares analíticos de um método incluem o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O LD corresponde à quantidade mais baixa de um analito numa amostra que pode ser detetada mas não, necessariamente, quantificada como um valor exato (36). Por outro lado, o LQ corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, este limiar analítico corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) marcando o início da gama de trabalho (41).

Segundo a instrução interna do método potenciométrico é espectável obter 0,6 g glucose/100 g MS (Matéria Seca) para o LD e 2,1 g glucose/100 g MS para o LQ.

2.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade é uma característica que avalia a capacidade de um método ou equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Em termos práticos, esta refere-se à inclinação da curva de calibração (33). Um método é chamado sensível se uma pequena mudança na concentração ou quantidade de substância a analisar reproduz uma grande variação no sinal medido (36).

2.3. Precisão

A precisão pretende avaliar a proximidade dos resultados obtidos entre ensaios independentes, em condições definidas (42). A precisão é definida a partir do desvio padrão (SD) ou a partir do desvio padrão relativo (RSD) que não é mais do que o coeficiente de variação (CV) (36). Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade (**r**) e reprodutibilidade (**R**). Entre estas duas medidas existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia (33).

Repetibilidade: Exprime a precisão em condições de repetibilidade, isto é, representa a variabilidade dos resultados esperada quando um método é realizado nas mesmas condições (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo). Estes ensaios permitem calcular o limite de repetibilidade (**r**), que é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (χ_i, χ_{i-1}), obtidos em condições de repetibilidade (33,43).

Para o CHE em pó está definido nos critérios da instrução interna da Nestlé que o limite de repetibilidade não deve ser superior a 0,3 g glucose/100 MS, já para a sopa de CHE não deve ser superior a 0,9 g glucose/100 MS.

Reprodutibilidade: representa a variabilidade de resultados independentes obtidos em diferentes condições, ou seja, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como, diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes dias, diferentes equipamentos e/ou diferentes épocas. Também para o caso da reprodutibilidade é possível calcular o respetivo limite, que é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (χ_i, χ_{i-1}), obtidos em condições de reprodutibilidade (33,43). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de métodos executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório procura a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através da comparação interlaboratorial (38).

Precisão intermédia: refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios

diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável de usar (38).

Para a precisão intermédia o limite de reprodutibilidade não deverá ser superior a 0,4 g glucose/100 MS.

2.4. Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações, ou seja, mede a sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua confiabilidade durante o uso normal (33,39,43). Essas variações podem incluir, por exemplo, variação dos dias, dos analistas, dos reagentes, entre outras. Através da combinação destas variações nas condições a realizar, pode-se determinar quais os fatores que têm uma influência significativa, ou mesmo crítica sobre os resultados analíticos (36). Assim, um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado (33).

2.5. Veracidade

A veracidade é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro, ou seja, esta pretende verificar a veracidade dos resultados (33,39). O termo veracidade, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e de erros sistemáticos (33).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a veracidade de uma metodologia são, entre outros, a análise de materiais de referência certificados, a participação em ensaios interlaboratoriais, em teste comparativos (33,38).

2.5.1. Materiais de referência certificados

Sempre que possível, os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Desta

forma, é importante que o fornecimento das amostras de referência seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis (como por exemplo: FAPAS, BIPEA e LGC Standards) (38).

O uso correto desta ferramenta permite avaliar o desempenho do Laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e veracidade do resultado. Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza previsto, o laboratório deve proceder à análise de causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, conforme o rigor definido para os seus resultados (33).

Para este parâmetro a veracidade do método potenciométrico será determinado pela recuperação, esperando que se obtenham valores próximos de 100%.

2.5.2. Ensaios interlaboratoriais

Para além do uso de MRC, existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante os objetivos a que se destinam.

-Ensaio Interlaboratorial de Aptidão: destina-se a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes (Guia ISO 43), funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório. Se possível, deve estar rastreado a um MRC, podendo geralmente os participantes usar os métodos que entenderem;

-Ensaio Interlaboratorial de Normalização: destina-se a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade. Neste caso, é condição de acesso a utilização exclusiva do método em causa.

Assim, quando o Laboratório pretenda avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade (parâmetros característicos) de um método, demonstrando em simultâneo que tem uma precisão compatível com a de outros laboratórios, pode recorrer a um ensaio do tipo de normalização. Por outro lado, quando tem por objetivo evidenciar a exactidão dos seus resultados, pode então participar em ensaios do tipo de aptidão (33).

2.5.3. Testes comparativos

Um outro contributo importante na validação de um método interno de ensaio consiste na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método de referência (35). O objetivo principal deste tipo de ensaio comparativo é o de estudar o grau de proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos

de ensaio, isto é, de avaliar a veracidade do método interno relativamente ao de referência (33,38).

2.5.4. Ensaio de recuperação

Na ausência de materiais de referência, ou para apoiar estudos de material de referência, a veracidade pode ser avaliada por recuperação. A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras com uma quantidade conhecida de analito (*spiking*). O analito pode ser adicionado às amostras em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo do limite de detecção, próximo da concentração máxima permissível e numa concentração próxima da média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é o facto de o analito adicionado não estar necessariamente na mesma forma que se apresentaria na amostra (38,39).

2.6. Incerteza da medição

Os estudos de validação produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina. A incerteza é uma característica associada ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos à quantidade destinada a ser medida (38). A metodologia utilizada para quantificar a veracidade do método, depende dos recursos disponíveis e do tipo de método de ensaio em causa. Assim, a quantificação da incerteza associada à pode ser feita através de:

- Análise de MRC;
- Ensaio de recuperação;
- Análise de amostras analisadas por um método de referência

Na análise da incerteza é determinada a incerteza padrão expressa como desvio padrão, e a incerteza expandida, expressa como 95% de intervalo de confiança.

3. Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo implementar e validar um novo método de análise para determinar dextrose equivalente em cereais hidrolisados enzimaticamente para o nível de hidrólise – $DE = 45$. Na fase de validação serão avaliadas as características de performance do método, nomeadamente: quantificação - limite de quantificação e limite de detecção; precisão (repetibilidade e reprodutividade intermedia), veracidade e incerteza de medição.

Como objetivos secundários pretende-se:

- Acompanhar diariamente as medições do CHE durante a produção industrial.
- Comparar os resultados obtidos do novo método com o método de referência e o método eletroquímico.
- Validar um novo equipamento de determinação de DE em linha - *Accu-Chek Performa*, que irá substituir o *Accu-Chek Aviva*; verificação da sua performance através da comparação com o equipamento anterior; determinação do novo fator de conversão a colocar em linha.

Procedimento experimental

Para a implementação/ validação do novo método para determinar dextrose equivalente em CHE, foram utilizadas metodologias de acordo com as instruções internas da Nestlé, as quais descrevem, detalhadamente, todos os procedimentos de análise. Neste capítulo serão, primeiramente, abordadas as metodologias rápidas de análise, que foram efetuadas no sector de fabricação do CHE e, posteriormente, as metodologias de referência que foram efetuadas no laboratório Físico-Químico.

4. Métodos rápidos de análise:

4.1. Determinação do teor de sólidos por refratometria

Para o cálculo da DE pelo método eletroquímico, foi necessário proceder, primeiramente, à análise do teor de sólidos pelo método rápido com recurso ao refratómetro de bancada ATAGO®. Desta forma, antes de se utilizar o refratómetro foi efetuado, diariamente, uma calibração com água destilada para o acerto do zero. Após a calibração ($0.00^{\circ}\text{Bx} \pm 0.05^{\circ}\text{Bx}$), colocou-se sobre o prisma a amostra de CHE – a amostra deve ser suficiente para cobrir o prisma. Procedeu-se à leitura pressionando a tecla “START”. O valor apresentado pelo refratómetro foi corrigido com um fator que é calculado periodicamente por autocontrolo no laboratório. Este fator corresponde à diferença média periódica entre o teor de sólidos calculados pelo método rápido e o de referência (método de estufa).

Numa fase inicial do trabalho, utilizou-se o fator de correção que já existia no sector, somando-se 3,01 à leitura apresentada pelo refratómetro. Posteriormente, este fator foi atualizado, após ter uma quantidade significativa de resultados, como se poderá ver mais à frente no capítulo dos Resultados e Discussão.

Foi efetuado semanalmente um controlo no método refratométrico através da leitura de uma solução padrão de sacarose 30% (Reagecon). Os resultados não deveriam diferir mais de 0,01 do que o valor padrão.

4.2. Determinação da Dextrose Equivalente do CHE pelo método eletroquímico ⁽¹⁹⁾

Como já foi referido anteriormente, a metodologia utilizada para determinar a DE no CHE no setor de fabricação consiste na utilização de um medidor de glicémia (Accu-check Aviva, Roche). Para esta análise, começou-se por recolher da tina de *stock* uma amostra de CHE para um frasco com tampa de rosca. De seguida, preparou-se uma solução de forma a se obter uma leitura no aparelho entre 180 mg/dl e 540 mg/dl. Desta forma, para uma DE esperado de ± 45 , pesou-se para um copo de 100 mL, 1 g de CHE e 99 g de água destilada. Agitou-se a solução com o auxílio de uma barra magnética, durante 5 minutos e ajustou-se a agitação para a velocidade 6. Reduziu-se a agitação para a velocidade 2 e introduziu-se uma vareta dentro do copo em agitação. Tocou-se com a vareta numa tampa de caixa de *petri*, para se libertar uma gota. Ajustou-se novamente a velocidade de agitação para a velocidade 6. Posteriormente, ligou-se o Accu-check e após o aparecimento do desenho de uma palheta na parte inferior do ecrã inseriu-se uma palheta. Verificou-se se o código da palheta que apareceu no ecrã coincidia com o código que está na caixa das palhetas. Após se ouvir um “bip” e aparecer uma imagem com uma palheta e uma gota encostou-se a palheta do aparelho Accu-check na gota da caixa *petri*. Registou-se o valor obtido. Foram efetuadas três leituras no aparelho utilizando em cada caso uma nova palheta e no caso do aparecimento de algum valor aberrante, procedeu-se a uma nova leitura.

Controlo:

De forma a verificar se o aparelho e as respetivas palhetas estavam a funcionar corretamente efetuou-se, semanalmente, um controlo através da leitura de duas soluções de controlo (Accu-check): uma solução de controlo 1 (baixo) e outra solução de controlo 2 (alta). Os resultados das leituras efetuadas foram comparados com a gama de valores aceitável que está impressa no rótulo do frasco de tiras-teste. Assim, para o nível de controlo 1 o valor do teste deveria situar-se entre 30-60 mg/dl e para o nível de controlo 2 entre 254-344 mg/dl.

4.3. Cálculo e expressão dos resultados

O cálculo da concentração de dextrose equivalente, expresso em g/100 g de matéria seca (MS), foi determinado através da seguinte fórmula:

$$DE = \frac{L\text{ Accu} - Chek \times F}{TS}$$

Sendo:

DE - Teor de Dextrose equivalente (%)

L Accu-chek - valor médio calculado a partir dos resultados obtidos pelo aparelho Accu-chek.

TS- valor do teor de sólidos corrigido dado pelo refratômetro ATAGO

F - Fator de conversão (ver ponto 4.3.1)

4.3.1. Determinação do fator de conversão F:

A aplicação do medidor de glicemia para determinar o valor da DE no CHE requer um fator de conversão, de forma a se obter resultados semelhantes aos obtidos pelo método de referência. Este fator de conversão “F” é feito periodicamente no laboratório Físico-Químico usando o método titulométrico de Lane - Eynon. Para tal, recolheu-se 20 amostras de CHE, da mesma receita, da linha de produção. Fez-se leituras em duplicado da solução com o Accu-chek e em paralelo, analisou-se a DE com o método de referência. Calculou-se o fator de conversão através da seguinte equação:

$$F = \frac{\text{reference DE} \times TS}{L\text{ Accu} - Check}$$

Sendo que:

F - Fator de conversão

Reference DE - Concentração de Dextrose Equivalente (g/100 g) determinada pelo método de referência

TS - Teor de sólidos determinado pelo método de referência

L Accu-chek - Valor médio calculado a partir dos resultados obtidos pelo aparelho Accu-chek.

5. Métodos de análise de referência

5.1. Determinação do teor de sólidos pelo método de estufa

O método de estufa consiste basicamente em secar a amostra em condições específicas e a perda de peso é usada para calcular o teor de sólidos. Para este método utilizaram-se os materiais a seguir listados na tabela:

Tabela 2 – Lista de reagentes e materiais utilizados para a determinação do teor de sólidos pelo método de estufa.

Reagentes	Materiais & Equipamentos
<ul style="list-style-type: none">• Areia do mar, purificada e calcinada, Merck	<ul style="list-style-type: none">• Exsicador 250 mm• Varetas de vidro 3-4 mm, largura max. 75 mm• Suporte para exsicador, em porcelana 240 mm• Cápsulas em níquel puro, fumado plano, numeradas, com tampa, 75*25 mm• Banho de água• Estufa, Heraeus 6060 T• Balança analítica eletrônica, leitura 0.1 mg Mettler AE 200

5.1.1. Procedimento

Dependendo da amostra a ser analisada, utilizaram-se dois tipos de cápsulas. Para amostras de Farinha Láctea Simples e amostra de referência (amostras em pó), utilizaram-se cápsulas sem areia, já para o CHE (amostra líquida) utilizaram-se cápsulas com areia. Antes de se utilizar as cápsulas, estas devem estar limpas e secas.

Para este procedimento, cada amostra foi analisada em duplicado.

5.1.1.1. Preparação e pesagem das cápsulas com areia

Primeiramente, colocou-se cerca de 25 g de areia em cada cápsula e adicionou-se uma vareta de vidro. De seguida, colocou-se a cápsula, com a tampa ao lado, por 4 horas (ou durante a noite) numa estufa a 102 ± 2 °C. Recolocou-se a tampa na cápsula antes de ser retirada da estufa, e transferiu-se imediatamente para o exsicador. Deixou-se arrefecer por 30 minutos à temperatura ambiente ao lado da balança. Pesaram-se as cápsulas com tampa (m1). Após cada pesagem, fechou-se o exsicador.

5.1.1.2. Pesagem das cápsulas sem areia

Retirou-se da estufa a 102 ± 2 °C as cápsulas com a tampa, colocaram-se no exsiccador e deixou-se arrefecer, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Seguidamente, pesaram-se as cápsulas com tampa (m1). Após cada pesagem, fechou-se o exsiccador.

5.1.1.3. Pesagem das amostras

Adicionou-se à cápsula tarada cerca de 2 – 3 g de produto (m2). Para as cápsulas com areia para o CHE, adicionou-se também cerca de 3 a 5 mL água destilada e misturou-se com a vareta de vidro, que foi depois deixada na cápsula.

5.1.1.4. Secagem

Para as cápsulas com o CHE, realizou-se uma primeira secagem do produto em banho-maria fervente (100°C) durante cerca de 20 minutos. Durante a secagem agitou-se, frequentemente o conteúdo da cápsula, de forma a evitar a formação de crostas. Posteriormente, colocou-se as cápsulas, de preferência no meio do tabuleiro da estufa a 102 ± 2 °C, com a tampa ao lado durante 3 h. Decorrido o tempo de secagem, taparam-se as cápsulas antes de serem retiradas da estufa e colocaram-se no exsiccador. Deixou-se arrefecer durante 30 minutos ao lado da balança. Pesou-se com aproximação a $\pm 0,1$ mg (m3).

5.1.2. Cálculos

Calculou-se o conteúdo de matéria seca do produto, expressa em percentagem, usando a equação seguinte:

$$TS (\%) = \frac{(m3 - m1)}{(m2 - m1)} \times 100$$

Onde:

M1 = massa da cápsula e da tampa, em g (tara)

M2 = massa da cápsula com a tampa e a amostra, em g (peso bruto)

M3= massa da cápsula com a tampa e a amostra depois de secar, em g

5.2. Determinação de DE pelo método titulométrico

Tal como já foi referido, o Lane - Eynon é o método titulométrico de referência utilizado no laboratório Físico-Químico para determinar DE no CHE. O procedimento a seguir descrito foi adaptado da instrução interna da Nestlé: Determinação de DE pelo método titulométrico. Para efetuar esta análise utilizaram-se uma série de reagentes e equipamentos que se encontram listados a seguir.

Reagentes:

- Sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Merck;
- Tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Merck;
- Hidróxido de sódio em pastilhas (NaOH), Merck;
- Iodeto de potássio (KI), Merck;
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 96 %, Merck;
- Cloreto de sódio (NaCl), Merck;
- Amido solúvel, Merck;
- Hidróxido de sódio 1 N;
- Tiossulfato de sódio penta hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em ampola, Merck;
- Antiespumante, Merck;
- Água ultra pura (18.2 M Ω . cm).

Materiais & Equipamentos:

- Agitador magnético, Methrohm E 649;
- Aquecedor de infravermelho, Stuart CR302;
- Balança analítica eletrónica, leitura 0,1 mg Mettler AE 200
- Cronómetro de bolso
- Pipetador automático, Brant
- Barra em aço com garras para suporte da coluna de refrigeração
- **Material de vidro:**
 - Balões de fundo plano 250 mL, Normax;
 - Pipeta volumétrica, classe AS, de 10 mL e 20 mL, Normax;
 - Coluna de refrigeração, RN macho 29/32, de 15 cm, GlassKeller
 - Frascos de vidro 1L, Duran
 - Bureta de vidro 25 mL, Qualicolor

5.2.1. Preparação dos reagentes

Para a preparação da solução de sulfato de cobre (Fehling I) dissolveu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, 70 g de sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) com água ultra pura (18.2 M Ω . cm) e aferiu-se à marca.

Para a preparação da solução de sal de Seignette (Fehling II) introduziu-se num balão volumétrico de 1000 mL, 350 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 100 g de NaOH em pastilhas. Dissolveu-se e perfez-se o volume com água ultra pura.

Para a preparação da solução de iodeto de potássio (KI) dissolveu-se num balão volumétrico de 1000 mL, 30 g de KI e 4 g de NaOH em pastilhas com água ultra pura e aferiu-se à marca.

Para a preparação da solução de ácido sulfúrico 1:4 (H_2SO_4) juntou-se num balão volumétrico de 1000 mL, com cuidado e agitação constante, 800 mL de água ultra pura a 200 mL de ácido sulfúrico a 96%. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e transferiu-se para um frasco de 1L.

Para a preparação da solução estabilizada de amido solúvel colocou-se num balão Erlenmeyer de 500 mL, 70 g de NaCl e 2,5 g de amido solúvel e dissolveu-se em 200 mL de água ultra pura. Aqueceu-se até à ebulição durante 3 minutos. Seguidamente, deixou-se arrefecer a 20 °C e depois filtrou-se para um frasco de cor âmbar.

Para a preparação da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) juntou-se num balão volumétrico de 1000 mL, 100 mL de NaOH 1N, e o conteúdo de uma ampola de tiosulfato de sódio penta hidratado 0,1 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Perfez-se o volume com água ultra pura. Conservou-se num frasco de vidro escuro.

5.2.2. Procedimento

5.2.2.1. Pesagem das amostras

Para as amostras em pó tais como, a Farinha Láctea Simples e a amostra de referência pesaram-se para uma barquinha, 0,120 mg \pm 0,010 de amostra. Já para a amostra de CHE, a toma de ensaio dependeu do seu teor em matéria seca. Desta forma, a massa da amostra a pesar é dada por: $\text{massa da amostra (g)} = \frac{12}{TS}$

Por exemplo, para uma amostra de CHE com uma matéria seca de cerca de 35%, o peso da amostra deve ser cerca de 0,3429 g.

5.2.2.2. Análise das amostras

Num balão de fundo plano de 250 mL, de colo esmerilado, adicionaram-se por ordem a amostra e com uma pipeta volumétrica 10 mL de Fehling I e 10 mL de Fehling II. De seguida, adicionaram-se 20 mL de água destilada e 2 a 3 gotas de antiespumante. Colocou-se sobre o balão uma coluna de refrigeração e pré aqueceu-se o aquecedor de infravermelhos durante 10 minutos. Levou-se a solução à ebulição em 2 minutos \pm 15 segundos. Manteve-se a ebulição durante 2 minutos suplementares (4 minutos de aquecimento no total). Após o tempo terminado, lavaram-se as paredes da coluna de refrigeração com 20 mL de água destilada. Sob água corrente, arrefeceu-se a solução a aproximadamente 30 °C. Seguidamente, adicionaram-se 10 mL de solução de iodeto de potássio, 10 mL de ácido sulfúrico 1:4, 1 mL de amido solúvel e uma barra magnética. Com uma bureta de 25 mL iniciou-se de imediato a titulação, sob agitação, com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 N até à viragem da cor da solução. Registou-se o volume total da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N utilizado (V1).

5.2.2.3. Ensaio em branco

Para o ensaio em branco efetuou-se em duplicado, o doseamento dos reagentes da mesma forma, mas sem a adição da amostra. Se a diferença entre os dois volumes utilizados na titulação fosse superior a 0,2 mL, repetir-se-ia o doseamento. Calculou-se a média dos volumes (V0). Repetiu-se o ensaio do branco de cada vez que um reagente fosse substituído.

5.2.2.4. Cálculo e expressão dos resultados

A Dextrose Equivalente, expressa em percentagem, é calculada através da seguinte fórmula:

$$DE = \frac{F (V0 - V1) \times 3,42 \times 10}{m \times TS}$$

Sendo que:

F - fator de correção para o título da solução de tiosulfato 0,1 N, em geral 1,00 (ver anexo 1)

V0 - Volume, em mililitros, de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N utilizado na titulação do ensaio em branco (deve estar compreendido entre 27,2 e 28,0 mL)

V1 - Volume, em mililitros, de solução de tiosulfato 0,1 N utilizados na titulação da amostra.

3,42 - Fator de cálculo (ver anexo 1)

m - massa da amostra, em gramas

TS - Teor de sólidos da amostra, em percentagem determinado pelo método de estufa (5.1)

6. Novo método de análise

6.1. Determinação de DE pelo método potenciométrico

Este método seguiu, de igual forma, uma instrução interna da Nestlé, no entanto, foi sujeito a algumas adaptações ao nível do equipamento utilizado. A instrução laboratorial de terminação da Dextrose Equivalente (29) cita a utilização de um titulador Metrohm 716 DMS Titrino e um eléctrodo Titrode Pt 6.0431.100 Metrohm, contudo neste procedimento utilizou-se um titulador Radiometer TIM 865 e dois eléctrodos: um eléctrodo de referência PHG 201-8 e um eléctrodo indicador M231 Pt-9. A seguir, encontram-se listados os reagentes e materiais utilizados para este procedimento.

Reagentes:

- Sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Merck
- Tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Merck
- Hidróxido de sódio em pastilhas (NaOH), Merck
- D-Glucose anidro, Merck
- Maltotriose, Sigma
- Água ultra pura ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

Materiais & Equipamentos:

- Copos de fundo plano, 150 mL, VWR
- Pipetas volumétricas AS, 3 mL, 5 mL, 7 mL, 20 mL
- Erlenmeyers de 100 mL com tampa, VWR
- Tubos para centrífuga 50 mL, VWR
- Garrafas de reagente âmbar, 1000 mL, Duran
- Garrafas de reagentes, 1000 mL, Dura
- Copo de vidro 400 mL
- Titulador automático Radiometer TIM 865 com uma bureta de 25 mL
- Eléctrodo indicador de Platina (Pt) M231 Pt-9, Radiometer
- Eléctrodo de referência PHG 201-8, Radiometer

- Centrífuga Hettich Rotanta 460
- Placa de aquecimento com agitação, Stuart CR302

6.1.1. Preparação dos reagentes

A preparação das soluções de Fehling I e II foram efetuadas da mesma forma que para o método de Lane - Eynon (ver 5.2.1).

Para a preparação da solução de glucose (1 mg/mL) dissolveu-se num frasco volumétrico de 1000 mL, exatamente 1,000 g \pm 0,0004 g de D – glucose anidra, em cerca de 800 mL de água ultra pura. Misturou-se bem e perfez-se até à marca, à temperatura ambiente.

Esta solução é estável durante uma semana numa garrafa de reagente.

6.1.2. Preparação de amostras de ensaio e soluções

6.1.2.1. Amostra de ensaio

Num Erlenmeyer de 100 mL, pesaram-se 2,000 g \pm 0,002 g de amostra e completou-se até 50,000 g \pm 0,005 g com água. Misturou-se fortemente à mão durante 2 minutos para dissolver completamente a amostra. Deixou-se decantar durante 10 minutos. Para amostras cuja solução não fosse muito clara para pipetar, como por exemplo, a Farinha Láctea Simples e a amostra de referência BFF, centrifugou-se em tubos de Falcon a 2000 rpm durante 10 minutos.

6.1.2.2. Preparação da solução teste

De acordo com o DE esperado da amostra e a sua matéria seca, colheu-se uma alíquota da amostra de ensaio, de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 3 - Alíquota a ser escolhida de acordo com o tipo de amostra, a sua matéria seca e dextrose equivalente esperada.

Amostra tipo	MS (g/100g)	DE esperada (g/100g MS)	Alíquota (mL)
Pó	\approx 97	20	5
		40	3
Sopa	\approx 30	20	20
		40	10
	\approx 40	20	15
		40	7
	\approx 50	20	10
		40	5

Nota: Se o volume do titulante excede-se 20 mL, analisou-se uma alíquota maior ou adicionou-se um volume conhecido de solução de glucose, que foi adicionado, posteriormente, ao volume de titulante para o cálculo de DE. Ajustou-se o volume adicionado de forma a atingir 80 mL (ver 6.1.4.2).

6.1.3. Condições de operação

Antes de se ter iniciado a análise de amostras no aparelho TIM 865 foi necessário proceder à sua programação definindo as condições de operação do instrumento. Esses parâmetros são discutidos mais à frente, no capítulo dos Resultados e Discussão.

A potência de aquecimento da placa de cerâmica foi ajustada de modo a permitir que o volume de amostra de 80 mL fervesse após 4 minutos.

6.1.4. Procedimento de operação

6.1.4.1. Titulação das soluções de Fehling

Num copo de fundo plano adicionaram-se por ordem: 5 mL de solução de Fehling I (pipeta de vidro), 5 mL de solução de Fehling II (pipeta de vidro) e 20 mL de água destilada (pipeta de vidro). Adicionou-se uma barra magnética. De seguida, colocou-se o copo na placa de aquecimento e ajustou-se a potência de aquecimento como descrito anteriormente (6.1.3). Mergulhou-se os elétrodos no líquido com velocidade de agitação lenta. Iniciou-se imediatamente a titulação: adicionou-se 50 mL de glucose (a velocidade de agitação foi aumentada) e a titulação começou após 4 minutos. Registou-se o volume de glucose titulado adicionando os primeiros 50 mL (V_0 em 6.1.5). Por fim, removeram-se e limpam-se os elétrodos com água destilada.

Nota:

- *A diferença entre duas titulações não deve ser superior a 0.50 mL de solução de glucose.*

6.1.4.2. Análise da amostra

Num copo de fundo plano adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling I e 5 mL de solução de Fehling II. A seguir adicionou-se o volume da alíquota com uma pipeta de acordo com a Tabela 3. Completou-se até 80 mL \pm 5mL com água destilada a ferver. Adicionou-se uma barra magnética e colocou-se o copo na placa de aquecimento, como referido anteriormente. Iniciou-se a titulação com a solução de glucose, quando a solução começou a ferver. Registou-se o volume de glucose necessária para titular a amostra (V_1 em 6.1.5). Por fim, removeram-se e limpam-se os elétrodos com água destilada.

Nota:

- *O tempo de titulação não deve exceder 3 -4 min para evitar reoxidação de cobre no fim da titulação.*
- *O volume de titulação deve ser entre 5 mL e 15 mL de solução de glucose, se exceder 20 mL, o*

volume da alíquota deve ser aumentada.

- *Se o volume de titulante exceder 20 mL e a alíquota não pode ser aumentada (DE muito baixo), adicionar um volume definido de solução de glucose e esperar até ao ponto de ebulição antes de iniciar a titulação.*

6.1.5. Cálculo e expressão dos resultados

Calculou-se o valor de DE expresso em g/100g de matéria seca usando a seguinte equação:

$$DE = \frac{(V0 - V1) \times 100 \times 100}{V \times \frac{M}{D} \times MS \times 1000}$$

Onde:

V0 - é o volume médio em mililitros de glucose de acordo com 6.1.4.1 (análise branco)

V1 - é o volume médio em mililitros de glucose de acordo com 6.1.4.2 (análise da amostra)

V - é o volume da alíquota de acordo com a Tabela 3

D - é o volume em mililitros usado na preparação da amostra (50 mL)

M - é a massa da amostra em gramas usado para a preparação de amostra

MS - é a matéria seca expressa em gramas por 100 gramas e determinado pelo método de estufa (5.1)

7. Análise estatística dos dados⁽⁴³⁾

Após se terem efetuado as análises às amostras (CHE, Farinha Láctea Simples e amostra de referência), através dos métodos anteriormente descritos, foi avaliada com recurso à estatística, a performance do novo método implementado. A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao *software* Ester/Q-Stat versão 4.8.0.1003, um programa estatístico usado pela Nestlé. Este programa utiliza a estatística robusta para o processamento dos resultados, o que permite identificar *outliers* (valores atípicos), com base no valor da mediana, sugerindo a sua exclusão.

Este programa permitiu obter valores de: média, desvio padrão, coeficiente de variação, limite de repetibilidade, recuperação, teste-t e valor-p.

- **Precisão**

Repetibilidade:

O SD da repetibilidade foi determinado para resultados obtidos em duplicado, a partir da seguinte equação:

$$SD(r) = 1,0484 \times Med_{i=1...n} \{|x_{i1} - x_{i2}|\}$$

Sendo:

n – é o número de determinações (simples ou em duplicado)

$Med \{xi\}$ – é a mediana do conjunto de resultados $\{xi\}$

xi – resultado individual incluído no conjunto de determinações, estando i entre 1 e n

$xi1$ e $xi2$ – dois resultados do conjunto de determinações em duplicado, estando i entre 1 e n

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) foi calculado segundo:

$$r = 2,772 \times SD(r)$$

Sendo:

$SD(r)$ – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados

Por sua vez, o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), também designado por desvio padrão relativo, expresso em percentagem, é dado por:

$$CV(r) = \frac{SD(r)}{Mediana}$$

Precisão intermédia:

O Desvio padrão da precisão intermédia foi determinado para resultados obtidos em duplicado, a partir da seguinte equação:

$$SD(iR) = \sqrt{SD^2(b) + \frac{1}{2} \times SD^2(r)}$$

Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (iR) foi calculado segundo:

$$iR = 2,772 \times SD(iR)$$

Sendo:

SD (iR) – desvio padrão da precisão intermédia associada aos resultados considerados

Por sua vez, o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{iR}), expresso em percentagem, é dado por:

$$CV(iR) = \frac{SD(iR)}{Mediana}$$

- **Limites analíticos**

Para o cálculo dos limites analíticos efetuou-se, primeiramente o cálculo da média e do desvio padrão dos resultados obtidos e a partir destes calculou-se os valores de LD e LQ.

Cálculo do limite de deteção: $LD = Média + 3 \times SD$

Cálculo do limite de quantificação: $LQ = Média + 10 \times SD$

- **Veracidade**

A veracidade é calculada a partir da recuperação. Por sua vez, o cálculo da recuperação depende da forma como o valor de referência foi obtido. Neste trabalho, foi utilizado uma amostra de referência certificada, com um valor conhecido. Assim, o cálculo da recuperação é efetuado através de:

$$Recuperação(\%) = \frac{\bar{C}_{medido}}{C_{referência}}$$

Sendo:

\bar{C}_{medido} – mediana dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC

$C_{referência}$ – valor certificado do MRC

- **Incerteza**

Incerteza do valor de referência:

$$\text{MRC: } SD_{ref} = \frac{u_{95\%}}{2}$$

$u_{95\%}$ – é a incerteza do valor de referência do MRC, encontrado no certificado e geralmente expresso como incerteza expandida.

Valor-p:

$$\text{Valor de valor-p calculado por estatística robusta: } SD_{Ref} = 1,2533 \times \frac{SD(R)_{robusto}}{\sqrt{n}}$$

$SD(R)$ – é o desvio padrão de reprodutibilidade calculado a partir dos resultados de valor-p e n é o numero de laboratórios envolvido no valor-p.

Desvio Padrão de recuperação:

O desvio padrão de recuperação é calculado a partir de:

$$SD(Rec) = Rec \times \sqrt{\frac{1}{n} \times \left(\frac{SD_{res}}{M_{res}}\right)^2 + \left(\frac{SD_{Ref}}{Ref}\right)^2}$$

Onde,

n – número de medições

SD_{res} – desvio padrão dos resultados

M_{res} – mediana dos resultados

SD_{ref} – desvio padrão da amostra de referência

Ref – valor de referência da amostra

Recuperação estatisticamente diferente de 100%:

Teste-t: $\frac{|1 - \text{Recuperação}|}{SD(\text{Recuperação})}$ (com $n-1$ graus de liberdade)

n – numero de medições

- Se $p < 0,05$: a recuperação é estatisticamente diferente de 100 %.
- Se $p > 0,05$: a recuperação não é estatisticamente diferente de 100 %.

Se a recuperação não for significativamente diferente de 100 %, a contribuição da recuperação para a incerteza tem de ser igual a SD (Recuperação):

$$SD (Rec)_{correcto} = SD (Rec)$$
$$CV (Rec)_{correcto} = \frac{SD (Rec)_{correcto}}{Recuperação}$$

Se o método for significativamente diferente de 100 %, o método é tendencioso (em inglês, *biased*) e a contribuição da recuperação para a incerteza tem de ser aumentada. Isto é feito através das seguintes fórmulas:

$$SD (Rec)^{*}corrigido = \sqrt{\left(\frac{1 - Recuperação}{2}\right)^2 + SD(Rec)^2}$$
$$RSD(Rec)^{*}corrigido = \frac{SD(Rec)^{*}corrigido}{Recuperação}$$

$$\text{Incerteza padrão: } u = \text{Mediana} \times \sqrt{CV(iR)^2 + CV(Rec)^2_{corrigido}}$$

$$\text{Incerteza expandida: } U = 2 \times u (\text{para nível de confiança aproximadamente 95\%})$$

Resultados e Discussão

Antes de se ter iniciado o estudo dos vários parâmetros de performance para a validação do método foi fundamental estudar o equipamento e a respetiva técnica analítica. Desta forma, neste capítulo irá ser feita uma primeira abordagem sobre a programação do equipamento e as curvas de resposta obtidas, antes de se terem obtido os resultados dos parâmetros de validação, que serão apresentados e discutidos mais à frente.

8. Programação do equipamento

Após se terem testado várias condições de operação, conseguiu-se chegar aos parâmetros ideais para a titulação de DE e que estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições gerais de operação do equipamento tal como estão descritas no titulador. (Alguma informação foi retirada por questões de confidencialidade)

Características operacionais
Mode: ... Measurement: mV Number of test: 1 Notification: No Cell grounding: Reference Blank: Yes Min ordinate: -2000 mV Max ordinate: 2000 mV QC sample: No Electrode ID: ... Titrant ID: D-Glucose Predose mode: mL Predose until: ... mL Start timer: 00 min 10 s Max. volume: ... mL Direction: Decreasing mV Stop point: ... mV Back titration: No Min speed: ... mL/min Max. speed: ... mL/min Smoothing parameter: 5 Number of IP: 1 Stop after last IP: No Addition: No Auxiliary output: No Inflection point no 1 Min. ordinate: ... mV Max. ordinate: ... mV

O parâmetro mais importante a ser discutido será o método escolhido para a titulação dos açúcares redutores que foi o modo contínuo. Este, permitiu obter uma curva de titulação em que a potência E do eletrodo = f (volume de titulante dispensado), tal como está representado na Figura 8.

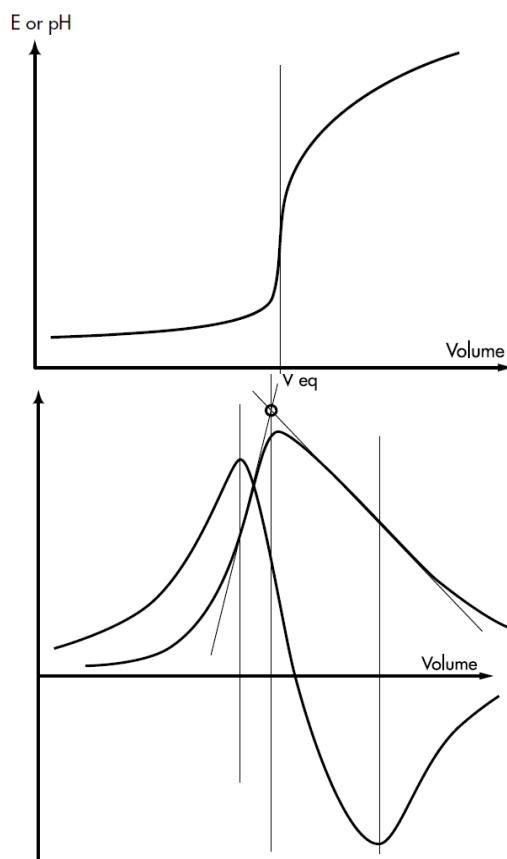


Figura 8 - Determinação do ponto de equivalência - método contínuo PI (ponto de inflexão) (Adaptado de: (44))

Para a determinação do ponto de equivalência é primeiro realizado o cálculo da primeira derivada com o processo “*smoothing*”. Este processo é utilizado para eliminar falsos pontos de inflexão que possam ocorrer em curvas com “ruído” devido, por exemplo, à fervura da solução. É necessário ter em conta que, aumentando este parâmetro, irá diminuir a capacidade de detetar pontos de inflexão fracos. Assim, escolheu-se um parâmetro de 5, tal como recomendado no manual do titulador automático. Posteriormente, há a determinação da curva de segunda derivada. Por fim, o ponto de inflexão é determinado pela interseção das tangentes da curva da primeira derivada a partir dos dois pontos de inflexão, mínimo e máximo, da curva da segunda derivada (44).

9. Curva potenciométrica

Após se ter programado o equipamento de forma adequada, iniciou-se os ensaios de titulação de acordo com o método que foi descrito anteriormente. No fim de cada titulação foi possível observar as curvas de titulação obtidas, no entanto, por questões de confidencialidade, na Figura 9 encontram-se exemplificadas duas curvas de titulação tipo e não as originais.

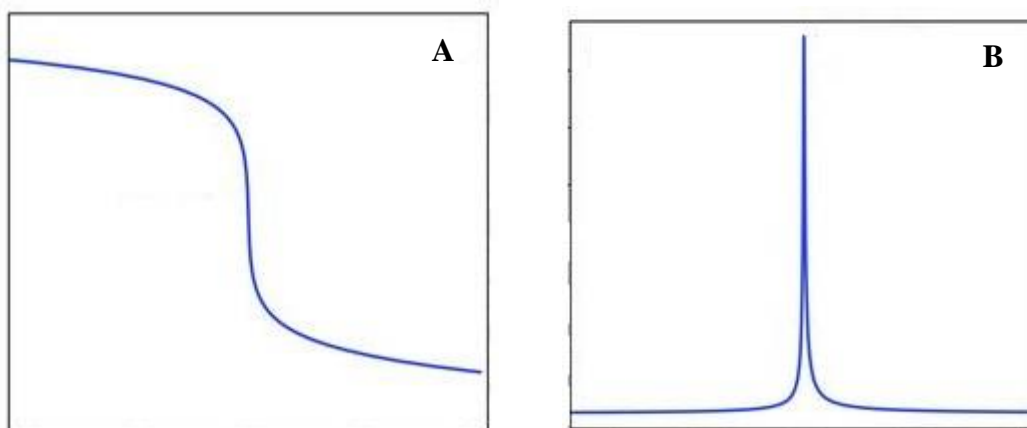
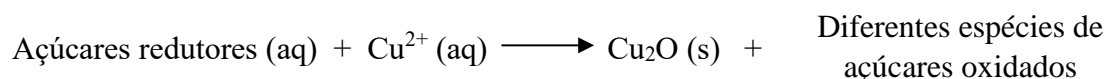


Figura 9 – **A** - Curva de titulação direta obtida da solução de Fehling; **B**- Curva da primeira derivada

A forma sigmoidal observada nas curvas de titulação, como mostra a Figura 9-A, estão de acordo com os dados reportados por Alexander *et al.* e é a forma esperada para uma titulação potenciométrica convencional. Através da Figura 9-A também é possível constatar que o potencial medido E (mV) variou de acordo com o volume (mL) de titulante adicionado. O valor redox da solução de cobre (mV) pode ser considerado quase constante no início do processo de titulação. Esse valor vai sofrendo pequenas alterações conforme se vai adicionando a solução de glucose, que leva à redução do cobre. Como se pode ver na reação abaixo representada, à medida que a titulação avança os açúcares redutores causam uma diminuição da concentração dos íons cúpricos presentes na solução.



O ponto de equivalência é então atingido quando todos os íons cúpricos estiverem reduzidos e isso é manifestado através de uma diminuição rápida no potencial registrado no eletrodo. De acordo com os estudos realizados por Britton *et al.*(45), a redução completa do

óxido cúprico é marcada por uma inflexão bem definida que se estende por mais de 200 milivolts, tornando-se os potenciais correspondentemente mais negativos. De facto, estas deduções são concordantes com os resultados obtidos. Após o ponto de equivalência ser detetado, observa-se que os potenciais não são alterados com a glucose que é adicionada por acréscimo. Por fim, o ponto de equivalência foi calculado pela tangente traçada na curva da primeira derivada como se encontra exemplificado na Figura 9-B.

O tipo de eléctrodo escolhido deve, por sua vez, responder às mudanças de concentração dos iões cúpricos na solução e deve também ser capaz de suportar as condições alcalinas e de ebulição necessários durante a titulação. Assim, os eléctrodos utilizados para este estudo foram um eléctrodo de vidro de pH usado como eléctrodo de referência e um eléctrodo indicador de platina (Pt), ambos com capacidade para suportar temperaturas de ebulição e de alcalinidade.

A equação de Nerst fornece uma relação matemática entre o potencial do eléctrodo e as concentrações das formas oxidada e reduzida de um analito em solução. Desta forma, o potencial do eléctrodo de platina durante a titulação será regido pela seguinte expressão:

$$E_{Pt} = \underbrace{E_{Cu^{2+} \rightarrow Cu^+}}_{E^\circ} - \frac{RT}{F} \log \frac{[Cu^+]}{[Cu^{2+}]}$$

Sendo:

E° - o potencial de redução para a reacção;

R – constante universal dos gases;

T – a temperatura em Kelvin;

F – constante de Faraday.

Assume-se que o pH seja constante ao longo da reacção, pelo que o eléctrodo de referência tem um potencial constante. Desta forma, o potencial depende do eléctrodo indicador de platina que é sensível à concentração dos iões cúpricos, que são rapidamente reduzidos a iões cuprosos ($Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$) no ponto de equivalência. Logo, o potencial redox medido vai ser dado por: $E_{lido} = E_{Ref} - E_{Ind}$.

10. Parâmetros de validação avaliados

Os métodos descritos no capítulo anterior permitiram a obtenção de resultados para avaliar o desempenho do novo método na determinação de DE. Para a validação do método, foram analisados quatro parâmetros de performance que compreenderam a precisão, a veracidade, os limiares analíticos e a incerteza de medição. Convém primeiramente salientar que o método usado no desenvolvimento deste trabalho é baseado numa instrução interna da Nestlé, isto é, o método já foi totalmente validado anteriormente, pelo que o laboratório de Físico-Químico não achou necessário realizar extensos estudos internos de validação. Esta mesma instrução recomenda para que cada laboratório verifique as características de performance do método, de forma a determinar os seus próprios valores. Assim, avaliou-se se era possível atingir as mesmas características de desempenho, comparando os valores obtidos com os critérios de aceitação que estão indicados na instrução interna da Nestlé.

As amostras utilizadas para avaliar estes parâmetros de validação foram escolhidas de modo a que representassem os principais tipos de matrizes a que seriam aplicadas a este método. Tal como é referido nos objetivos deste trabalho, a aplicabilidade do método potenciométrico destina-se principalmente na determinação de DE em CHE, no entanto, este método também é aplicável para produtos que contenham açúcares redutores. Uma vez que, o CHE é um ingrediente que entra na formulação de alguns produtos que são fabricados na Nestlé, foi também determinado a DE em produtos terminados, mais concretamente na Farinha Láctea Simples. A utilização de diferentes produtos permitiu averiguar se a resposta do aparelho é afetada perante diferentes características principalmente, em termos de matriz, visto que o CHE se trata de um produto líquido e por outro lado, a Farinha Láctea Simples de um produto em pó. Para além disso, o laboratório Físico-Químico participa semestralmente em testes de proficiência, pelo que também se avaliou a performance do método utilizando uma amostra de referência de 2016. Esta amostra consiste basicamente de uma amostra com uma textura muito semelhante à da Farinha Láctea Simples.

Para além destes parâmetros, a validação de um método de ensaio compreende ainda a avaliação da especificidade, robustez e a quantificação que engloba, a curva de calibração, gama de trabalho, linearidade, limiares analíticos e a sensibilidade. A especificidade e a robustez, não foram determinados pois, segundo o guia de validação de métodos químicos da Nestle (37) estes parâmetros devem ser avaliados aquando o desenvolvimento do método. Por outro lado, o estudo da quantificação envolve a utilização de uma série de amostras

(padrões), cada uma com uma concentração diferente e conhecida do analito. No entanto, ao longo deste estágio não foi possível a obtenção de amostras padrão. Desta forma, não foi possível determinar uma série de parâmetros de validação, nomeadamente, a curva de calibração, a gama de trabalho, a linearidade e a sensibilidade.

10.1. Especificidade

Como acabado de referir, a especificidade é um parâmetro que deve ser avaliado aquando o desenvolvimento do método. No entanto, segundo o guia interno da Nestlé da validação e verificação de métodos químicos, a especificidade de um método pode ser fundamentada com base em argumentos científicos.

Segundo, a bibliografia científica exposta na parte introdutória desta tese, este método baseia-se no mesmo princípio de Lane-Eynon, um método que já é utilizado desde há muito e que já foi comprovado que mede o que é suposto medir, ou seja, açúcares redutores (26). Segundo um estudo conduzido por Tavares *et al.*, (46) este método poderá ser suscetível à interferência de outros tipos de moléculas que atuam como agentes redutores, nomeadamente o ácido ascórbico. No entanto este composto não afeta a determinação de DE no CHE, pois este é um produto que resulta da hidrólise enzimática da farinha, não havendo adição de qualquer outro tipo de ingredientes para além do que já foi referido inicialmente na seção da introdução. Os blocos vitamínicos apenas são adicionados numa fase posterior, aquando a preparação do processo de fabricação da Farinha Láctea simples.

Desta forma, pode-se dizer que o método é específico para a determinação de DE no CHE, sendo este o principal produto a qual será aplicado o método. Relativamente à determinação de DE na Farinha Láctea simples, o valor não é significativamente alterado porque a interferência é mais significativa em alimentos com o conteúdo de vitamina C acima de 500 mg/100g produto (46).

10.2. Precisão

A precisão permitiu avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos sobre a mesma amostra e amostras idênticas. Para avaliar a precisão do método em estudo, recorreu-se a dois tipos de medidas, nomeadamente, a repetibilidade, que foi estudada em várias amostras de CHE e Farinha Láctea Simples e na amostra de referência (BFF-2 2016) e a precisão intermédia, que foi apenas estudada na amostra de referência.

Uma vez que, a análise da precisão através da reprodutibilidade é obtida a partir da participação de vários laboratórios, esta via não será aqui descrita visto não ter sido adotada ao longo deste estágio.

10.2.1. Repetibilidade de várias amostras de CHE e Farinha Láctea Simples

Para o estudo da repetibilidade (precisão entre ensaios) analisaram-se 23 e 13 amostras de CHE e Farinha Láctea Simples, respetivamente, para as quais se efetuaram análises independentes em duplicado de cada amostra, pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e usando o mesmo equipamento. Os resultados de desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade dizem respeito aos replicados (duplicado) de cada amostra.

Os resultados de DE obtidos para cada produto, expresso em g glucose/100 g MS, encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resultados de repetibilidade obtidos para o CHE.

Amostra	DE do CHE		Média	SD
	Rep.1	Rep.2		
1	41,88	41,87	41,88	0,01
2	41,86	42,21	42,04	0,25
3	51,75	51,72	51,74	0,02
4	38,96	39,47	39,22	0,36
5	39,49	39,16	39,33	0,23
6	45,51	45,65	45,58	0,10
7	40,66	40,57	40,62	0,06
8	43,30	43,20	43,25	0,07
9	39,14	39,23	39,19	0,06
10	42,28	42,36	42,32	0,06
11	38,43	38,69	38,56	0,18
12	44,82	44,87	44,85	0,04
13	45,43	45,39	45,41	0,03
14	43,99	43,47	43,73	0,37
15	46,38	46,33	46,36	0,04
16	46,70	46,19	46,45	0,36
17 ^a	48,55	47,42	47,99	0,80
18	43,79	43,63	43,71	0,11
19	44,81	45,06	44,94	0,18
20	44,12	44,33	44,23	0,15
21	44,26	43,83	44,05	0,30
22	40,55	40,75	40,65	0,14
23	44,20	43,76	43,98	0,31
SD (r)	0,19			
CV (r) (%)	0,4			
r*	0,52			

* - Limite de repetibilidade calculado para um nível de confiança de 95%

^a – Resultados rejeitados

Tabela 6 – Resultados de repetibilidade obtidos para a Farinha Láctea Simples

Amostra	DE da Farinha Láctea Simples		Média	SD
	Rep. 1	Rep. 2		
1	23,89	24,05	23,97	0,11
2	24,30	24,33	24,32	0,02
3 ^a	24,34	24,83	24,59	0,35
4	24,00	23,84	23,92	0,11
5	24,45	24,36	24,41	0,06
6	23,76	23,57	23,67	0,13
7	24,35	24,46	24,41	0,08
8	24,51	24,58	24,55	0,05
9	24,02	24,04	24,03	0,01
10	23,77	23,55	23,66	0,16
11	25,50	25,50	25,50	0,00
12	24,59	24,59	24,59	0,00
13	24,63	24,63	24,63	0,00
SD (r)	0,084			
CV (r) (%)	0,3			
r*	0,23			

* - Limite de repetibilidade calculado para um nível de confiança de 95%

^a – Resultados rejeitados

Durante a análise dos valores no programa Q-Stat, foram detetados valores aberrantes: 1 valor para cada grupo de resultados de cada produto, tendo sido estes rejeitados.

Através dos resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, começa-se por referir que as amostras possuem diferentes valores de DE, sendo que para o CHE obteve-se valores entre 38,56 e 51,74 % enquanto que para a Farinha Láctea Simples obteve-se um valor mais certo, isto é entre 23,66 e 25,50 %. Isto deve-se ao fato do CHE ser um produto que por natureza do tipo de reação bioquímica pode variar de lote para lote, enquanto que a Farinha Láctea Simples é doseado para se obter uma composição final definida. Desta forma, o CHE é misturado com o resto dos ingredientes tendo em conta o valor de CHE utilizado e o valor desejado de DE para o produto final. Isto reflete-se nas diferenças de precisão entre produtos distintos. O CHE foi o que apresentou uma maior dispersão de resultados, como se pode comprovar através do coeficiente de variação de repetibilidade, sendo de 0,4 % comparativamente à Farinha Láctea Simples, que foi de 0,3 %. Para além do coeficiente de variação, calculou-se também o limite de repetibilidade para resultados duplicados, a partir

do desvio padrão, o qual forneceu informação relevante, permitindo averiguar qual o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95%. Nos casos estudados, o CHE foi também a amostra que apresentou uma maior variação entre valores de diferentes ensaios, correspondendo esta a 0,52 g/100g MS, enquanto que a Farinha Láctea Simples apresentou a menor variação, de apenas 0,23 g/100g MS. Estes valores, por sua vez, estão de acordo com os que estão indicados na instrução original, encontrando-se abaixo de 0,3 e 0,9 g/100g MS para CHE em pó e sopas de CHE, respetivamente. Para além disso, verificou-se que foi possível satisfazer a condição $[(X_i - X_{i-1}) < r]$. Por exemplo, tomando os valores da amostra de CHE número 14, a diferença obtida entre os duplicados foi de 0,52 g/100g MS. No caso da amostra 18, esta diferença é de 1,13, maior do que o valor do limite de repetibilidade de referência e por isso foi rejeitado.

10.2.2. Repetibilidade e precisão intermédia da amostra de referência

Na análise da amostra de referência BFF-2 2016 o programa Q-Stat forneceu os valores de repetibilidade e de precisão intermédia para o mesmo grupo de resultados. O estudo da precisão intermédia teve como objetivo avaliar a influência de variações dentro do próprio laboratório, sendo esta medida a mais representativa dos resultados a serem observados durante a utilização do método na rotina. Deste modo, para este estudo foram realizadas 7 análises em duplicado sobre a mesma amostra, com o mesmo equipamento, mas em diferentes dias, com 4 diferentes analistas e diferentes reagentes de forma a obter um valor de reprodutibilidade intermedia que abranja todas as fontes relevantes de incerteza.

Assim, nas Tabelas 7 e 8 estão representados os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade e precisão intermédia respetivamente. Os valores de desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade da Tabela 7 foram efetuados para replicados de cada amostra, já na Tabela 8 o cálculo da precisão intermédia foi efetuada em relação aos replicados entre séries.

Tabela 7 – Resultados de repetibilidade referentes à amostra de referência de 2016.

Dia	DE da amostra de referência		Média	SD
	Rep.1	Rep.2		
12/04/2017	29,40	29,43	29,42	0,02
26/04/2017	29,51	29,00	29,26	0,36
27/04/2017	29,04	29,25	29,15	0,15
28/04/2017	29,54	29,69	29,62	0,11
02/05/2017	29,48	29,28	29,38	0,14
04/05/2017	29,31	29,19	29,25	0,08
05/05/2017	29,30	29,41	29,36	0,08
Média	29,36			
SD (r)	0,16			
CV (r) (%)	0,5			
r*	0,44			

* - Limite de repetibilidade calculado para um nível de confiança de 95%

Para os estudos de repetibilidade para a amostra de referência, obteve-se em média uma DE de 29,36 %, ou seja um valor intermédio entre o CHE e a Farinha Láctea Simples. O desvio padrão de repetibilidade obtido foi de 0,16, resultando num coeficiente de variação de 0,5%. O valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95% foi de 0,44.

Tabela 8 – Resultados referentes aos ensaios da precisão intermédia para a amostra de referência BFF-2 2016

Dia	DE da amostra de referência	
	Rep.1	Rep.2
12/04/2017	29,40	29,43
26/04/2017	29,51	29,00
27/04/2017	29,04	29,25
28/04/2017	29,54	29,69
02/05/2017	29,48	29,28
04/05/2017	29,31	29,19
05/05/2017	29,30	29,41
Média	29,36	
SD (iR)	0,19	
CV (iR) (%)	0,6	
iR*	0,52	

* - Limite de reprodutibilidade intermédia calculado para um nível de confiança de 95%

Tendo por base os dados obtidos para o estudo da precisão intermédia, verifica-se que houve uma maior dispersão de resultados, como seria de esperar, pois também foram

introduzidas mais variáveis no estudo. Essa dispersão pode ser corroborada comparando o coeficiente de variação obtido para o ensaio de precisão intermédia que foi de 0,6 % (Tabela 8) com o da repetibilidade que foi de 0,5 % (Tabela 7). O mesmo se verificou para o limite de reprodutibilidade intermédia, sendo igual a 0,52 (Tabela 8) e portanto superior ao limite de repetibilidade. O valor da precisão intermédia, mencionado na instrução, recomenda para que não seja superior a 0,4 g glucose/100 g MS, no entanto, o valor obtido foi ligeiramente superior a este. Atendendo que os analistas participantes neste estudo estavam a executar o método pela primeira vez e, uma vez que se trata de um método mais complicado para pessoas inexperientes pode-se afirmar que os resultados obtido estão dentro dos critérios internos de aceitação.

10.2.3. Incerteza de medição associada à precisão

A contribuição da precisão para a incerteza de medição corresponde ao coeficiente de variação da reprodutibilidade intermediária CV (iR) ou seja, igual a 0,6 %.

10.3. Quantificação

Por vezes, a matriz pode perturbar as medições impondo interferências nas respostas dos aparelhos, o que pode causar desvios dos resultados do teor esperado de analito numa determinada amostra. O método de adição padrão é considerado um dos métodos mais simples para eliminar a influência de interferências sobre os resultados. Este método consiste, basicamente, em adicionar quantidades conhecidas de analito, à amostra a ser analisada aumentando a resposta do analito em relação à magnitude de resposta do aparelho (47). Uma vez que, não foi possível obter amostras padrão para realizar a calibração do método realizou-se um ensaio de método de adição padrão. Assim, a 10 g de amostras de CHE foram adicionadas, respetivamente 0,2, 0,3 e 0,4 g de D-glucose, homogeneizando bem a amostra. Procedeu-se à leitura das amostras conforme indicado no ponto 6.1.4. Os resultados obtidos encontram-se a seguir na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios de TS e DE obtidos pelo método potenciométrico a partir de amostras de CHE contaminadas com 0,2, 0,3, 0,4 g de glucose D-anidra;

Amostra	TS	DE
CHE	34,77	43,34
CHE + 0,2 g glucose	36,54	46,82
CHE + 0,3 g glucose	37,01	47,87
CHE + 0,4 g glucose	37,47	48,31

Com os resultados das amostras com glucose adicionada traçou-se um gráfico relacionando a quantidade de DE obtida nas amostras (eixo das ordenadas) com a quantidade de glucose adicionada (eixo das abcissas). O gráfico obtido encontra-se a seguir ilustrado (Figura 10).

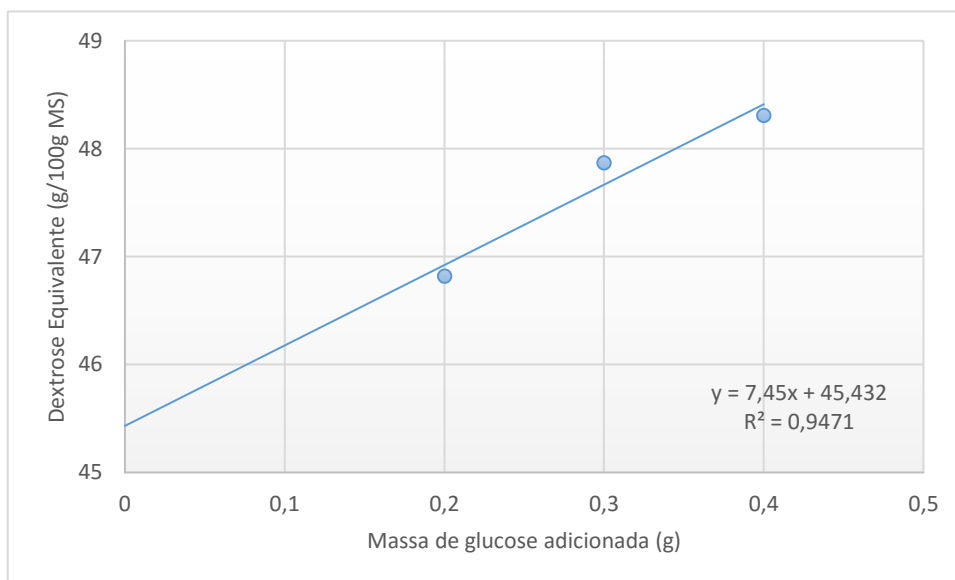


Figura 10 – Representação gráfica da linha de regressão obtida contaminando uma amostra de CHE com 0,2, 0,3 e 0,4 g de glucose-D anidra.

A equação linear obtida a partir dos resultados foi $y = 7,45x + 45,432$ com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,9471$. A partir da equação, quando $x = 0$ o valor de y corresponde ao valor de DE da amostra original suplementada, se todos os açúcares redutores presentes fossem glucose. Este valor de 45,43 g glucose/ 100 g MS é superior ao valor de DE determinado experimentalmente para a mesma amostra antes da suplementação, o qual foi de 43,34 g glucose/ 100 g MS (Tabela 9). A diferença de valores de DE entre o valor do gráfico e o obtido por titulação potenciométrica é igual a 2,09 g glucose/100 g MS. No entanto, na amostra de CHE os grupos OH titulados correspondem não só a glucose,

como também a moléculas de açúcares de maior massa molecular, como por exemplo maltose, maltotriose, entre outros.

Vamos tecer algumas considerações teóricas sobre esta diferença. Se os 2,09 g glucose/100 g MS correspondessem apenas a moléculas de glucose ter-se-ia 0,0116 moles de glucose (Tabela 10). Como foi dito anteriormente, é expectável ter a contribuição de outros açúcares presentes numa amostra de CHE. Desta forma, foi realizado um exercício teórico para explicar esta diferença considerando que uma amostra de CHE tivesse 1,2 g de glucose, 0,6 g de maltose, 0,2 g de maltotriose e 0,0009g de maltotetraose (para um total de massa correspondente a 2,09 g). Tendo em conta o peso molecular de cada açúcar e de acordo com a sua massa estipulada, calculou-se o número de moles que cada açúcar estaria a contribuir para o DE, tendo-se obtido um valor total de 0,00882 moles ao qual corresponde uma DE de 1,588. Desta forma é possível entender que o valor determinado experimentalmente do DE deve ser inferior ao valor obtido por extrapolação.

Tabela 10 – Estimativa de açúcares superiores à glucose, que poderão estar presentes no CHE

Massa de Açúcares g)	Peso Molecular (g/mol)	Moles
1,2 g glucose	180	0,00660
0,6 g maltose	342	0,00170
0,2 g maltotriose	504	0,00039
0,009 g maltotetraose	666	0,00013
Total = 2,09		0,00882

Pode-se ainda averiguar que o método potenciométrico reage a pequenas diferenças de analito quando se contaminou as amostras de CHE, obtendo-se um comportamento linear que pode ser comprovado pelo valor de R^2 obtido. Desta forma, a partir de todas estas deduções pode-se concluir que o método está a quantificar corretamente.

10.3.1. Limiares analíticos

Segundo Relacre (33), quando um método quantitativo é aplicado a gama de concentrações altas, não há necessidade de se determinar os limiares analíticos. Contudo, optou-se por fazê-lo, pois uma das amostras de referência de 2017 possui um valor baixo de DE (cerca de 5 g glucose/ 100g MS). Desta forma, a determinação dos limiares analíticos do método potenciométrico foi realizado com o âmbito de determinar o menor valor de

concentração do analito que pode ser detetado e verificar, ainda, qual a menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação com uma determinada exatidão e precisão.

Segundo o guia interno da Nestlé sobre validação e verificação de métodos químicos, os limiares analíticos do método podem ser determinados, através do desvio padrão de uma amostra considerada como branco. Os limiares analíticos foram então calculados a partir de análises efetuadas em farinha BTP (Farinhas com Baixo Teor de Pesticidas), tal como também foi efetuado no desenvolvimento da instrução original de determinação de DE em CHE, sendo que o valor para o LD está definido ser 0,6 g/100g MS e para o LQ igual a 2,1 g/100g MS.

Para esta determinação efetuaram-se os cálculos, quer para o limite de deteção como para o limite de quantificação com base nas fórmulas apresentadas anteriormente, na seção do Procedimento Experimental.

A determinação destes limites foi feita através da análise de 6 replicados da mesma amostra de farinha (ver Tabela 18, anexo 2). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11 a seguir apresentada.

Tabela 11 – Resultados referentes ao cálculo de LD e LQ.

Média	Desvio Padrão	LD	LQ
0,29	0,12	0,66	1,53

Analisando os resultados da Tabela 11, a média dos valores obtidos foi de 0,29 g glucose/100g MS, sendo o respetivo desvio padrão 0,12. Verifica-se que este método consegue detetar a presença de analito com uma certeza estatística razoável a partir de uma dextrose equivalente correspondente a 0,66 g glucose/100 g MS, ou seja, esta é a resposta mínima do instrumento para a qual se pode detetar DE numa amostra, não sendo necessariamente quantificada como valor exato. Por outro lado, este método pode quantificar DE de uma amostra com determinada precisão e exatidão a partir de uma DE de 1,53 g glucose/100 g glucose. Assim sendo, pode-se concluir que os valores obtidos estão dentro dos parâmetros definidos pela instrução.

10.4. Veracidade e incerteza de medição

Tal como já foi mencionado, a veracidade é um meio que permite determinar a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro, verificando a confiabilidade e veracidade dos resultados. No método em estudo a veracidade foi avaliada a partir de MRC. Relativamente aos MRC, estes foram obtidos a partir de entidades devidamente certificadas.

Para o estudo deste parâmetro foram efetuadas análises a 3 amostras de referências, sendo que uma foi delas corresponde à amostra de referência de 2016, em que é conhecido o valor de referência dos açúcares presentes na amostra. Uma vez que, o relatório das duas amostras de referência de 2017, com os respetivos valores certificados de DE, não foi reportado atempadamente para serem aqui apresentados e discutidos, avaliou-se o parâmetro da veracidade com os valores certificados da amostra de referência de 2016. De referir, que no ano passado, o método para determinar DE não entrava nos testes de proficiência do laboratório pelo que a amostra não contém valor certificado para este parâmetro. Esta amostra apenas contém os valores certificados de açúcares que são determinados por HPLC.

Assim, de forma a ter uma noção aproximada do comportamento do método para este parâmetro, foi somado o valor certificado dos açúcares redutores presentes na amostra (pois são equivalentes de dextrose), e assumiu-se esse valor como o valor certificado de DE. Uma vez que, o cálculo da DE envolve a determinação do teor de sólidos e esta é uma amostra que já foi aberta há algum tempo, o cálculo dos açúcares foi feito tendo em conta a humidade presente de 2,04 % (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores certificados dos açúcares para a amostra de referência BFF-2 2016.

Açúcar	Valor certificado em g/100g produto
Glucose	11,38
Maltose	12,40
Lactose	5,13
Total:	28,91

Numa primeira fase do estudo, efetuaram-se análises ao MRC e os valores obtidos experimentalmente foram comparados com o valor certificado do MRC, estimado como 28,91 % com aproximadamente 1% de incerteza, o qual corresponde a uma incerteza

absoluta de 0,261 g glucose/100 g MS. A veracidade é avaliada em termos de recuperação, isto é, a razão entre o valor observado e o valor esperado. Quanto mais próxima for a razão de 1 (100%), menores serão as diferenças no método. Também foi avaliada a incerteza do MRC através do teste-t e valor-p.

Foram efetuadas 7 análise do MRC em duplicado, em diferentes dias e por diferentes analistas (Tabela 19 Anexo 3). Os resultados obtidos encontram-se a seguir apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados relativos à veracidade e à incerteza do MRC.

$\bar{C}_{observado}$	29,36
$SD_{observado}$	0,15
$C_{referência}$	28,91
Rec (%)	101,6
SD (Rec)	0,009
Teste-t	1,661
valor-p	0,148
$SD(Rec)_{correto}$	0,009
$CV (Rec)_{correto} (\%)$	0,9
<i>u</i>	0,33
<i>U</i>	29,36 ± 0,66

Segundo o guia de validação e verificação de métodos químicos da Nestlé (43), a recuperação é significativamente diferente de 100% para um intervalo de confiança de 95%, se o valor de p é inferior a 0,05. Se for igual ou superior a 0,05 a recuperação não é significativamente diferente de 100 %. Para além disso, também se pode verificar que a recuperação não é significativamente diferente de 100% quando a contribuição da recuperação para a incerteza global é igual a SD (Rec):

$$SD (Rec)_{correto} = SD (Rec)$$

$$CV (Rec)_{correto} = \frac{SD (Rec)_{correto}}{Recuperação}$$

Analisando os resultados referentes ao estudo da veracidade, verifica-se que a recuperação obtida foi de 101,6%, isto é superior a 100%, indicando que o método estará a quantificar outros açúcares redutores, como por exemplo, maltotriose, que não estejam descritos na amostra de referência, por se tratarem de pequenas quantidades. Também é necessário realçar que existe uma incerteza associada à amostra e às próprias medições realizadas.

O valor-p obtido foi de 0,148 e, por isso, superior a 0,05, indicando que o método não tem uma recuperação significativamente diferente de 100%. A incerteza padrão obtida para este método foi então de 0,33 e o intervalo onde se espera incluir uma grande fração da distribuição de valores razoavelmente atribuível ao mensurado é $29,36 \pm 0,66$, o que corresponde à incerteza expandida. De acordo, com o que está definido na instrução para um CHE em pó com um conteúdo de DE de 16,4 g/ 100g MS, a incerteza expandida é de $\pm 0,8$ g/100 g MS. Assim, apesar do conteúdo de DE da amostra de referência ser diferente pode-se concluir que o método em estudo apresenta resultados exatos cumprindo os critérios internos na Nestlé.

11. Comparação de métodos

Um outro objetivo deste trabalho consistiu em fazer a comparação do novo método potenciométrico, com o método titulométrico de Lane-Eynon e com o método eletroquímico usado no sector de fabricação. O principal objetivo desta comparação foi o de estudar a proximidade dos resultados obtidos entre os métodos de ensaio antes de por em funcionamento apenas o equipamento TIM. Desta forma, foram analisadas diariamente as mesmas amostras de CHE no método potenciométrico e no método titulométrico. Na Tabela 14 estão representados os valores obtidos por estes dois métodos.

Tabela 14 - Análise comparativa dos resultados de DE obtidos para o método potenciométrico e para o método titulométrico de Lane-Eynon para amostras de CHE.

Data	Método potenciométrico				Método titulométrico				Diferença entre métodos
	Rep.1	Rep.2	Média	SD	Rep.1	Rep.2	Média	SD	
11/01/2017	41,88	41,87	41,88	0,01	41,07	40,65	40,86	0,21	1,02
12/01/2017	41,86	42,21	42,04	0,18	40,89	41,38	41,14	0,25	0,90
16/01/2017	38,94	39,50	39,22	0,28	40,47	39,43	39,95	0,52	-0,73
18/01/2017	39,49	39,16	39,33	0,17	39,71	39,46	39,59	0,13	-0,26
20/01/2017	45,51	45,65	45,58	0,07	44,71	43,59	44,15	0,56	1,43
23/01/2017	40,66	40,57	40,62	0,04	40,01	39,33	39,67	0,34	0,94
24/01/2017	43,30	43,20	43,25	0,05	40,18	40,59	40,39	0,21	2,86
25/01/2017	39,14	39,23	39,19	0,04	38,82	38,64	38,73	0,09	0,45
26/01/2017	42,28	42,36	42,32	0,04	39,24	39,50	39,37	0,13	2,95
31/01/2017	44,82	44,87	44,85	0,02	43,36	43,50	43,43	0,07	1,42
02/02/2017	45,43	45,39	45,41	0,02	43,03	43,23	43,13	0,10	2,28
03/02/2017	43,99	43,47	43,73	0,26	41,62	41,50	41,56	0,06	2,17
06/02/2017	46,38	46,33	46,36	0,03	44,24	44,87	44,56	0,31	1,80
07/02/2017	46,70	46,15	46,43	0,28	45,17	45,36	45,27	0,09	1,16
14/02/2017	48,55	47,42	47,99	0,56	46,31	46,20	46,26	0,05	1,73
15/02/2017	43,79	43,63	43,71	0,08	43,55	44,41	43,98	0,43	-0,27
16/02/2017	44,81	45,06	44,94	0,13	45,20	45,31	45,26	0,05	-0,32
17/02/2017	44,12	44,33	44,23	0,11	43,25	43,25	43,25	0,00	0,97
22/02/2017	44,36	43,73	44,05	0,32	43,38	43,52	43,45	0,07	0,59
04/04/2017	40,55	40,75	40,65	0,10	41,16	41,10	41,13	0,03	-0,48
10/04/2017	44,20	43,76	43,98	0,22	42,69	42,81	42,75	0,06	1,23
Média	-			0,14	-			0,18	1,04

Após a análise dos dados da Tabela 14, foi possível verificar que em média a diferença entre métodos é de 1,04 g glucose/ 100g MS. O método potenciométrico tem tendência a apresentar valores de DE superiores ao método titulométrico. Avaliando a dispersão de resultados duplicados de cada método, verifica-se que o método potenciométrico apresenta uma maior precisão (SD=0,14) do que o método titulométrico (SD=0,18). A diferença máxima obtida pelos dois métodos foi de 2,95 g glucose/100 g MS. Também foi realizada uma análise de regressão dos dados (Figura 11) para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio.

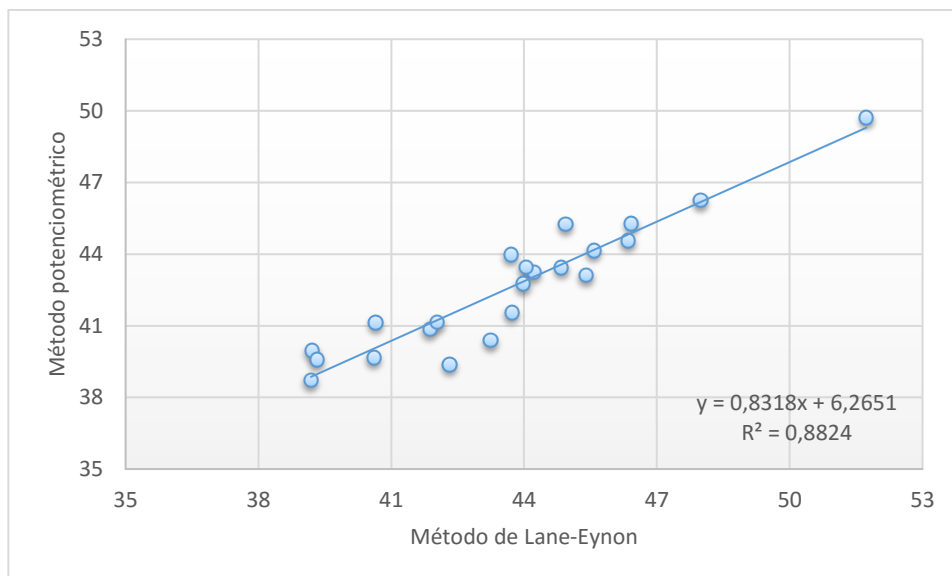


Figura 11 - Regressão linear entre o método potenciométrico e titulométrico de Lane-Eynon

A análise de regressão dos dados forneceu um coeficiente de correlação de 0,8824 e um declive de 0,8318 indicando que os dois métodos apresentam uma boa correlação entre si. Com base nas experiências descritas por Alexander *et al.*(27) uma análise de regressão entre o método potenciométrico e o método de Lane-Eynon forneceu um coeficiente de correlação de 0,9960 e um declive de 0,9603. Assim, estas deduções são concordantes com os resultados obtidos.

Foram também analisadas diariamente as mesmas amostras de CHE no método potenciométrico e no método eletroquímico. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 15 a seguir apresentada.

Tabela 15 - Análise comparativa dos resultados de DE obtidos para o método potenciométrico e para o método eletroquímico para amostras de CHE.

Data	Método potenciométrico				Método eletroquímico				Diferença entre métodos
	Rep.1	Rep.2	Média	SD	Rep.1	Rep.2	Média	SD	
11/01/2017	41,88	41,87	41,88	0,01	44,88	44,00	44,44	0,44	-2,56
12/01/2017	41,86	42,21	42,04	0,18	44,93	45,45	45,19	0,26	-3,16
16/01/2017	38,94	39,50	39,22	0,28	43,51	42,94	43,22	0,29	-4,00
18/01/2017	39,49	39,16	39,33	0,17	45,30	44,10	44,70	0,60	-5,37
20/01/2017	45,51	45,65	45,58	0,07	49,77	49,42	49,59	0,18	-4,01
23/01/2017	40,66	40,57	40,62	0,04	42,87	43,92	43,40	0,52	-2,78
24/01/2017	43,30	43,20	43,25	0,05	43,09	43,91	43,50	0,41	-0,25
25/01/2017	39,14	39,23	39,19	0,04	41,16	40,89	41,03	0,14	-1,84
26/01/2017	42,28	42,36	42,32	0,04	43,76	42,96	43,36	0,40	-1,04
31/01/2017	44,82	44,87	44,85	0,02	41,24	41,87	41,55	0,31	3,29
02/02/2017	45,43	45,39	45,41	0,02	44,28	44,18	44,23	0,05	1,18
03/02/2017	43,99	43,47	43,73	0,26	41,53	43,74	42,64	1,11	1,09
06/02/2017	46,38	46,33	46,36	0,03	46,01	47,08	46,54	0,53	-0,19
07/02/2017	46,70	46,15	46,43	0,28	45,09	46,11	45,60	0,51	0,83
14/02/2017	48,55	47,42	47,99	0,56	44,87	45,96	45,41	0,55	2,57
15/02/2017	43,79	43,63	43,71	0,08	44,04	42,31	43,17	0,87	0,54
16/02/2017	44,81	45,06	44,94	0,13	43,73	44,45	44,09	0,36	0,85
17/02/2017	44,12	44,33	44,23	0,11	45,44	46,17	45,80	0,36	-1,58
22/02/2017	44,36	43,73	44,05	0,32	45,66	46,45	46,06	0,39	-2,01
10/04/2017	44,20	43,76	43,98	0,22	44,17	44,47	44,32	0,15	-0,34
Média	-			0,14	-			0,42	-0,94

A partir dos resultados da Tabela 14, foi possível verificar que em média a diferença entre os dois métodos é de -0,94 g glucose/ 100g MS. Por outro lado, os resultados sugerem que o método potenciométrico tem tendência a apresentar valores de DE inferiores ao método eletroquímico sendo que a diferença máxima obtida pelos dois métodos foi de 5,37 g glucose/100 g MS e por isso superior à diferença máxima obtido com o método titulométrico. Avaliando a dispersão de resultados de cada método, verifica-se que o método potenciométrico apresenta igualmente, uma maior precisão (SD=0,14) do que o método eletroquímico (SD=0,42). Também foi realizada uma análise de regressão dos dados (Figura 12) para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio.

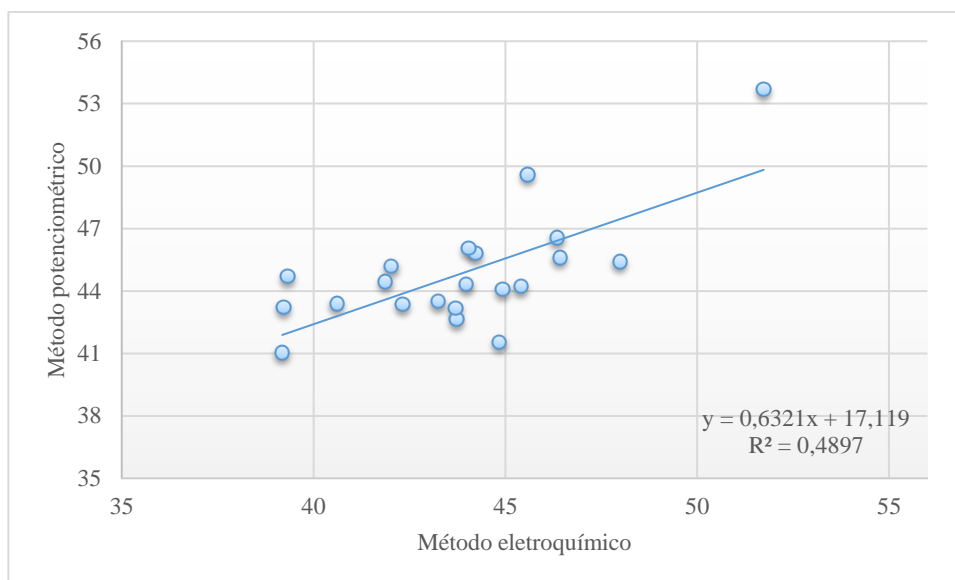


Figura 12 – Gráfico de dispersão de resultados obtidos pelo método potenciométrico e eletroquímico

Contrariamente ao que foi obtido com o método titulométrico, o gráfico de correlação do método potenciométrico com o método eletroquímico apresentou uma dispersão de resultados ($R^2 = 0,4897$). Tal como já foi referido anteriormente, o método eletroquímico é utilizado no sector de fabricação para monitorizar de forma rápida o valor de DE no CHE, permitindo detetar erros numa fase precoce e antecipar o retrabalhamento do produto. Os limites estabelecidos para a DE do CHE são entre 40 – 48 g glucose /100 g MS. Desta forma, caso haja algum valor fora de normas o resultado obtido por este método é confirmado com o método de referência no laboratório. Assim, o erro apresentado por este método não irá prejudicar a produção, pois para além do CHE não ter uma gama de limites restrita de DE, qualquer valor que esteja fora de normas é confirmado pelo método de referência. No entanto, a forma como estes valores serão tratados para utilização em linha deverá ser definido pela fábrica, sendo que poderá ser necessário uma correção específica para o aparelho.

12. Trabalhos complementares desenvolvidos na empresa

Durante o meu estágio em ambiente empresarial, para além do trabalho desenvolvido para alcançar o objetivo principal desta dissertação, realizei também outros trabalhos. Numa fase inicial do estágio, atualizei os fatores de correção do método refratométrico e do fator de conversão do método eletroquímico, da instrução de trabalho presente na linha de produção do CHE. Já numa fase final do estágio, realizei a validação de dois novos aparelhos *Accu-chek Performa* para a determinação de DE pelo método eletroquímico para o sector de fabricação e foi feita as análises das amostras de referência para a participação nos testes de proeficiência 2017.

12.1. Atualização de fatores

Como já foi referido, o fator de correção para o refratómetro é calculado pela média das diferenças entre este método e o de referência. Os resultados obtidos para este estudo encontram-se na Tabela 20 no Anexo 4. Pela análise da tabela verifica-se que para um conjunto de amostras de CHE, obteve-se uma média de diferenças de 1,01. Como o fator que estava inicialmente definido era de 3,01, à leitura apresentada pelo refratómetro passou-se a somar 2,01.

Para a determinação do fator de conversão do *Accu-chek*, da análise efetuada a um conjunto de 20 amostras de CHE obteve-se um fator de conversão médio de 5,36.

12.2. Validação dos aparelhos *Accu-chek Performa*

Para a validação dos novos aparelhos *Accu-chek Performa*, começou-se por determinar o fator de conversão de cada um, inclusive do antigo medidor (*Accu-chek Aviva*) para atualização e efeitos de comparação. Tal como está indicado no ponto 4.3.1 no capítulo do Procedimento experimental, realizou-se leituras em duplicado, com os aparelhos, das 20 soluções preparadas a partir das amostras de CHE. Em paralelo, analisou-se a DE por potenciometria. O fator de conversão foi calculado a partir da fórmula do ponto 4.3.1 estando os valores obtidos, apresentados na Tabela 16. Os valores de DE por potenciometria, teor de sólidos por estufa e a leitura obtida por cada aparelho encontram-se na Tabela 21, no anexo 5.

Tabela 16 – Fatores de conversão obtidos para: (A) - *Accu-chek Aviva*, (B) - *Accu-chek performa* e (C) - *Accu-chek Performa*.

	<i>Accu-chek Aviva (A)</i>	<i>Accu-chek Performa (B)</i>	<i>Accu-chek Performa (C)</i>
Fator de conversão	5,62	5,44	5,41

Pela análise da Tabela 16, é possível verificar que os dois novos aparelhos, B e C, apresentam um fator de conversão relativamente semelhante, enquanto que o aparelho A obteve um fator ligeiramente superior. Também é possível ver na Tabela 22 (ver anexo 5) que a média das diferenças dos resultados de DE obtidos pelo método potenciométrico e pelos aparelhos A, B e C foram 0,29, 0,30, 0,31, respetivamente.

Conforme indicado na instrução interna da Nestlé de determinação rápida de DE em CHE (19), o próximo passo consiste na avaliação da veracidade do método usando o programa estatístico Q-Stat. A veracidade de um método alternativo representa a proximidade dos valores médios obtidos pelo método alternativo em comparação com os valores médios obtidos pelo método de referência (usando as mesmas amostras). A veracidade foi, desta forma, estimada analisando 10 amostras de CHE em duplicado pelo método alternativo e pelo método de referência, de forma a serem detetadas diferenças sistemáticas e/ou proporcionais.

A presença de diferenças sistemáticas significa que a diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos são constantes ao longo da gama de concentração. Esta é detetada executando análises de diferenças. Por outro lado, os erros proporcionais significam que a diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos depende da concentração sendo que esta é detetada executando uma análise de regressão.

Após se analisarem as amostras, os valores obtidos (ver Tabela 23, no Anexo 5) foram inseridos no Q-Stat. Numa primeira fase, é avaliada a gama de concentração das amostras aplicando-se uma fórmula de cálculo para determinar se se trata de uma diferença proporcional ou sistemática.

$$Gama \% = \frac{Máx_{valores\ ref.} - Min_{valores\ ref.}}{Max_{valores\ ref.}}$$

Se o valor obtido for inferior a 20% são considerados os resultados da análise de diferenças (diferenças sistemáticas). Caso contrário, se o valor for superior a 20% consideram-se os resultados da análise de regressão (diferença proporcional). Assim, a gama

relativa obtida para o conjunto amostral analisado para os dois aparelhos foi de 4,6 % e por isso inferior a 20% considerando-se desta forma, os resultados da análise de diferenças. O método é, por sua vez, validado quando os seguintes critérios de veracidade, apresentados na Tabela 17 são cumpridos:

Tabela 17 - Critérios de validação para a análise de diferenças (diferenças sistemáticas).

Passo	Indicadores de performance	Critérios
1.	Visualização do gráfico de diferenças	Os pontos devem estar distribuídos aleatoriamente em torno da linha $y=0$
2.	Análise de diferenças	As diferenças não devem ser significativamente diferentes de 0.

Na Figura 13 a seguir, estão apresentados os gráficos de diferenças com os pontos distribuídos em torno da linha $y=0$.

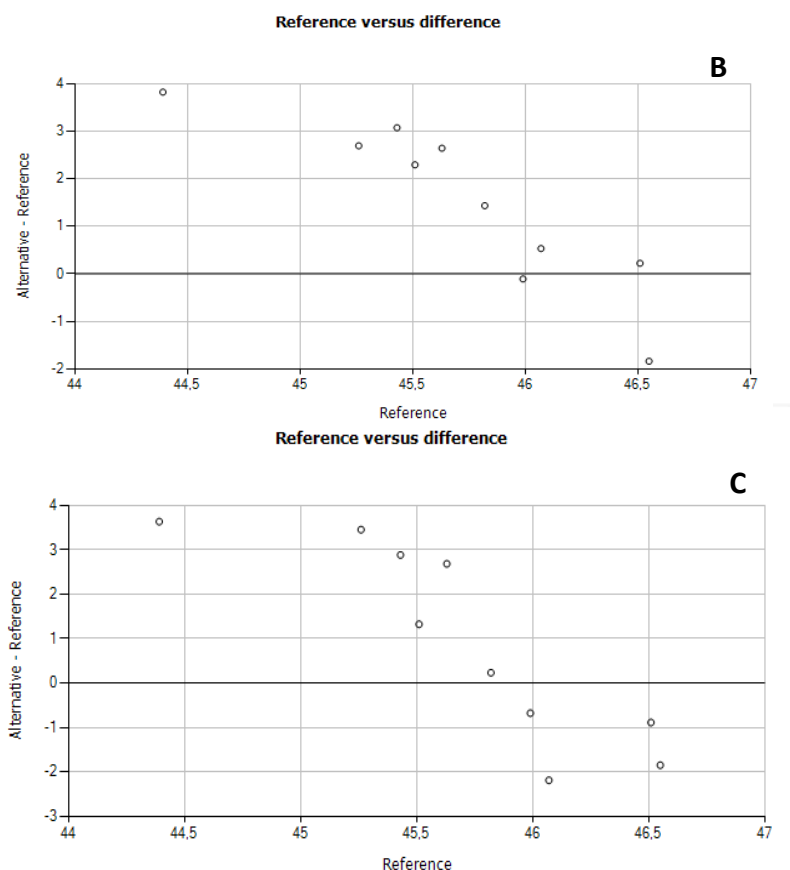


Figura 13 - Gráficos com a distribuição dos pontos referentes aos valores de referência vs a diferença entre o método alternativo e de referência para o aparelho B e C.

A partir dos gráficos obtidos é possível constatar que os pontos estão, de fato, distribuídos aleatoriamente em torno da linha $y=0$. Por outro lado, o desvio padrão das diferenças obtido foi de 2,212 e 3,041, para o aparelho B e C, respectivamente e não são significativamente diferentes de 0 pois o valor-p obtido para os dois aparelhos foi superior a 0,05. Assim, o relatório do Q-Stat indica que sob o ponto de vista estatístico, o método alternativo é verdadeiro em comparação com o método de referência.

12.3. Participação nos Testes de proficiência

Os testes de proficiência compreendem a avaliação periódica da competência ou do desempenho analítico de laboratórios individuais participantes. Esta ação é dependente de um coordenador externo que distribui MRC. Os laboratórios participantes analisam os materiais pelo método de escolha e retornam os resultados ao coordenador. Os resultados dos testes obtidos por diferentes laboratórios são posteriormente comparados entre si e o desempenho de cada participante avaliado com base num fator de desempenho (Z-Score) (36).

Desta forma, foram efetuadas as análises às amostras de referência de 2017 e que se encontram nas Tabelas 24 e 25 em Anexo 6. Como já tinha sido referido, o relatório dos resultados não foi reportado atempadamente pelo que não foi possível chegar a nenhuma conclusão acerca do desempenho do laboratório no que se refere à determinação da DE.

12.4. Outros trabalhos desenvolvidos na empresa

- Inventário no armazém dos materiais e reagentes;
- Elaboração de várias instruções, nomeadamente, tradução para português da instrução do novo método potenciométrico para determinar DE; instrução com a programação do Titulador TitraLab TIM 865 para o método dos cloretos e para o método da DE; instruções de utilização dos novos aparelhos Accu-Chek Performa;
- Formação dos analistas na determinação de DE pelo novo método potenciométrico;
- Acompanhamento e colaboração na análise das várias amostras que chegam diariamente ao laboratório Físico-Químico, nomeadamente:
 - ✓ Realização de absorção atómica para determinação de cálcio, ferro, potássio, magnésio e zinco;
 - ✓ Análise de açúcares por HPLC;
 - ✓ Análise dos vários parâmetros de controlo das águas;
 - ✓ Método de ELISA para determinar micotoxinas (aflatoxina, desoxinivalenol e ocratoxina em farinhas e sêmolos de milho);
 - ✓ Método titulométrico para determinação de ácido ascórbico;
 - ✓ Granulometria de cafés;

Conclusão

Neste trabalho pretendia-se validar um novo método de referência para determinar DE em CHE, de forma a substituir o método antigo. Inicialmente, começou-se por se estudar os parâmetros ideais para a titulação potenciométrica dos açúcares redutores presentes no CHE. Posteriormente, iniciou-se a validação do método que compreendeu a determinação de diversos parâmetros tais como precisão, quantificação - limiares analíticos, veracidade e incerteza de medição. Os dados obtidos foram comparados com os parâmetros definidos na instrução original da Nestlé de determinação de DE por potenciometria.

Através de argumentos científicos foi possível fundamentar que o método é específico para o objetivo em estudo. Em termos de precisão, o método obteve limites de repetibilidade de 0,23 e 0,52 g glucose/ 100 g MS para Farinha láctea simples e CHE respetivamente, estando estes valores dentro do estipulado na instrução. Estes resultados permitiram ainda verificar que diferentes produtos e, portanto, diferentes matrizes afetam a precisão do método. Relativamente ao estudo da precisão para a amostra de referência o limite de repetibilidade obtido foi de 0,44 e o limite de reprodutibilidade de 0,52. O motivo pelo qual o limite de reprodutibilidade ser superior poderá ser devido aos analistas participantes estarem a executar o método pela primeira vez.

Através do método de adição padrão foi possível verificar que o método é capaz de distinguir pequenas diferenças de concentração de glucose, quando amostras de CHE são adicionadas com quantidades conhecidas de glucoses. Com o âmbito de determinar o menor valor de concentração do analito que o método potenciométrico é capaz de detetar e, ainda verificar qual a menor concentração a partir da qual é possível a sua quantificação foram determinados os limiares analíticos. Os resultados obtidos demonstram que o método consegue detetar DE a partir de 0,66 g glucose/ 100 g MS e permite quantificar com uma determinada precisão e exatidão a partir de 1,53 g/100 g MS, estando também estes valores de acordo com o referenciado na instrução.

Para avaliar a veracidade do método efetuaram-se estudos de recuperação aplicado a materiais de referência certificados. Os resultados demonstram que a recuperação obtida é igual a 101,6% e não é significativamente diferente de 100 %, consideram-se desta forma que o método potenciométrico é um método exato.

Também fazia parte dos objetivos deste trabalho, a comparação do método potenciométrico com o método titulométrico de Lane-Eynon e com o método eletroquímico. Em ambos os casos, o método potenciométrico foi o método que apresentou uma menor dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos sobre a mesma amostra. Para além disso, o método potenciométrico e o método de Lane-Eynon mostraram um coeficiente de correlação 0,8824.

Como complemento do trabalho foi ainda realizado a validação de dois aparelhos medidores de glicémia (*Accu-chek Performa*) para serem usados no setor de fabricação do CHE. Para este processo determinou-se primeiramente o fator de conversão de cada aparelho e posteriormente determinou-se a veracidade de cada um. Os resultados obtidos foram satisfatórios e são correlacionados com o método de referência.

Em jeito de conclusão, os resultados obtidos permitiram atingir o principal objetivo deste trabalho: Implementar e verificar a performance do novo método para determinar dextrose equivalente em cereais hidrolisados enzimaticamente. O método potenciométrico é por conseguinte, útil para análises de rotina, para eliminar a necessidade de detetar a mudança de cor de azul-de-metileno no ponto final no método Lane-Eynon, o que pode ser difícil para operadores inexperientes. Propõe-se ainda como perspetiva futura verificar o comportamento do método para CHE com valores mais baixo de DE, assim como verificar o comportamento do método de referência e método de linha para as mesmas amostras.

Por fim realço o quanto enriquecedor foi para mim a realização deste trabalho que me permitiu crescer tanto a nível pessoal como profissional. O trabalho realizado em contexto empresarial permitiu-me ter contato com os processos de controlo utilizados nas linhas de produção e o laboratório Físico-Químico do departamento de Garantia da Qualidade. Esta experiência facultou-me conhecimentos na implementação de um método, assim como a aquisição de novas competências que acredito que serão úteis num futuro próximo.

Referências Bibliográficas:

1. Grodent C, Ramos Carnasa J. New Instruction: Enzymatic Hydrolysis of Cereals (CHE). Vevey; 2014.
2. Nestec LTD. Enzymatic Hydrolysis of Cereals (CHE). 1986.
3. McKeivith B. Nutritional aspects of cereals. Br Nutr Found. 2004;29:111–42.
4. Simpson BK. Food Biochemistry and Food Processing. 2 ed. New Delhi: Wiley-BlackWell; 2012.
5. Muralikrishna G, Nirmala M. Cereal α -amylases - An overview. Carbohydr Polym. 2005;60(2):163–73.
6. Van Der Maarel MJEC, Van Der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. J Biotechnol. 2002;94(2):137–55.
7. Oates CG. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. Trends Food Sci Technol. 1997;8(11):375–82.
8. Uthumporn U, Zaidul ISM, Karim AA. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. Food Bioprod Process. Institution of Chemical Engineers; 2010;88(1):47–54.
9. Reddy NS, Nimmagadda A, Rao KRSS. An overview of the microbial α -amylase family. African J Biotechnol. 2003;2:645–8.
10. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem. 2000;31:135–52.
11. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. Process Biochem. 2003;38(11):1599–1616.
12. Damhus T, Kaasgaard S, Olsen HS. Novozymes. 4 ed. 2013. 76 p.
13. Zohra RR, Ali S, Qader U, Pervez S, Aman A. Influence of different metals on the activation and inhibition of α -amylase from thermophilic *Bacillus firmus* KIBGE-IB28. Pak J Pharm Sci. 2016;29(4):1275–8.
14. Singh H, Soni SK. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. Process Biochem. 2001;37(5):453–9.
15. Robertson GH, Wong DWS, Lee CC, Wagschal K, Smith MR, Orts WJ. Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient biorefining of grain. J Agric Food Chem. 2006;54(2):353–65.
16. Nielsen SS. Food Analysis Laboratory Manual. 2 ed. West Lafayette, IN, USA: Springer; 2010.
17. Storz E, Steffens K-J. Feasibility Study for Determination of the Dextrose Equivalent (DE) of Starch Hydrolysis Products with Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). Starch J. 2004;56(2):58–62.
18. Dziedzic SZ, Kearsley MW. Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives. 2012. 275 p.
19. Berrut S. Farinaceous Products: Rapid DE in CHE by Accu-chek. 2010.
20. Caldas BS, Constantino LV, Silva CHGA, Madeira TB, Nixdorf SL. Comparative assessment of sugar in concentrated and nectar grape juices by refractometry, spectrophotometry and chromatography. Sci Chromatogr. 2015;7(1):53–63.
21. Hill B. Accu-Chek® Advantage: Electrochemistry for Diabetes Management. Curr Sep. 2005;21(2):45–8.

22. Roche Diabetes Care. Accu-chek Aviva [Internet]. Mannheim; 2015. Available from: <http://www.accu-chek.pt>
23. Coleman WK, Tai GCC, Clayton S, Howie M, Pereira A. A portable monitor for the rapid assessment of processing quality of stored potato tubers. *Am Potato J.* 1993;70(12):909–23.
24. Delheye G, Moreels E. Dextrose Equivalent Measurements. 1988;40(11):430–2.
25. Slack P. Determination of reducing sugars by the constant volume modification of the Lane & Eynon method. In: *Analytical methods manual*. England: Leatherhead Food; 1982.
26. Shaffer PA, Hartmann AF. The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis. *J Biol Chem.* 1920;
27. Alexander PWI, Hartati RD, Curtin J. Automated Potentiometric End Point Determination in the Lane-Eynon Titration of Reducing Sugars. *Electroanalysis.* 1989;1(1989):263–9.
28. Rong Y, Sillick M, Gregson CM. Determination of dextrose equivalent value and number average molecular weight of maltodextrin by osmometry. *J Food Sci.* 2009;74(1):33–40.
29. Louvrier A, Guillaume-Gentil O. Farinaceous Products: Dextrose equivalente (DE) in CHE. 2010.
30. Radiometer Analytical. Titralab 860 and 865 [Internet]. 2008. p. 1–341. Available from: www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=23448818103
31. Papastathopoulos DS, Nikolelis DP, Hadjiioannou TP. Determination of reducing sugars in honey, marmalades and fruit juices using a copper ion-selective electrode. *Analyst* [Internet]. 1977;102(1220):852. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=an9770200852>
32. Noakes R., Schwede AM, Schweinsberg DP. A semi-automatic method for the potentiometric determination of reducing sugars. *Proc Aust Soc sugar cane Technol.* Brisbane; 1981;
33. Castro A, Cabrita L, Marques A, Contreiras A, Ferreira A, Alfaiate B, et al. Guia 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. 1ª. Guia Relacre 13. 2000. 50 p.
34. ISO - International Organization for Standardization. ISO 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005. p. 28.
35. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2002;74:835–55.
36. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2004;23(8):535–52.
37. Moulin J. Guidelines for the validation and verification of chemical methods. Lausanne; 2015.
38. Instituto Nacional de Metrologia, Industrial N e Q. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. 2003.
39. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. [Internet]. Eurachem Guide. 1998. 1-61 p. Available from: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>
40. IPAC. Guia para a acreditação de laboratórios químicos [Internet]. Caparica; 2011. 1-21 p. Available from: www.ipac.pt
41. ICH Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 4 ed. 2005. 13 p.
42. ISO - International Organization for Standardization. ISO 5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definition. 1994.
43. Moulin J. Guidelines for the validation and verification of chemical methods. Vevey; 2015.
44. Radiometer Analytical. Titralab 860 and 865 - Reference Manual. 2008.

45. Britton HTS, Phillips L. The Potentiometric Titration of Glucose with Alkaline Tartrate Solutions of Copper , including Fehling ' s Solution. 1844;(18).
46. De Queiroz Tavares JT, Cardoso RL, Costa JA, De Souza Fadigas F, Fonseca AA. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. Quim Nova. 2010;33(4):805–9.
47. Andersen JET. The standard addition method revisited. TrAC - Trends Anal Chem [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;89:21–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.013>
48. Grodent C, Ramos Carnasa J. New Instruction: Enzymatic Hydrolysis of Cereals (CHE). Vevey; 2014. Report No.: MI-07.114.
49. Digital Hand-held “Pocket” Refractometer PAL [Internet]. [cited 2016 Dec 1]. Available from: http://www.atago.net/product/?l=en&f=products_pal.html

Anexos

Anexo 1

Verificação do título da solução de tiossulfato de sódio 0,1 N (fator F)

Num balão *erlenmeyer* de 100 mL, pesou-se com aproximação a 0,1 mg, 130 a 160 mg de iodato de potássio. Adicionou-se água destilada e aqueceu-se ligeiramente para dissolver todos os cristais de KIO_3 . Adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico 1:4 (1.4) e titulou-se imediatamente com a solução de tiossulfato de sódio. Perto do fim da titulação, ou seja, após a adição de 35 a 38 mL de solução de tiossulfato, adicionou-se 0,5 mL de solução estabilizada de amido. Titulou-se gota a gota até à descoloração da solução azul.

Calcular o fator F sobre a média de pelo menos dois ensaios.

Cálculo:

142,7 mg de KIO_3 correspondem a 40,0 mL de solução de tiossulfato de sódio 0,1 N.

Exemplo:

Amostra KIO_3 : 154,7 mg

Volume de tiossulfato utilizado: 43,56 mL

$$43,56 \times \frac{142,7}{154,7} = 40,18 \text{ ml}$$

$$F = \frac{40}{40,18} = 0,9955 = 1,00$$

Fator de cálculo:

O fator de cálculo 3,42 está definido na instrução e correlaciona os resultados do método Schoorl com os do método Lane-Eynon obtidos em diversos tipos de CHE à base de arroz e trigo.

Anexo 2

Tabela 18 – Valores de DE para a Farinha BTP

Replicado	DE Farinha BTP
1	0,19
2	0,36
3	0,13
4	0,22
5	0,49
6	0,37

Anexo 3

Tabela 19 - Resultados das análises de DE para a amostra de referência de 2016, realizadas em condições de reprodutibilidade intermédia

Data	Rep.1	Rep.2	Média
12/04/2017	29,40	29,43	29,42
26/04/2017	29,51	29,00	29,26
27/04/2017	29,04	29,54	29,15
28/04/2017	29,54	29,69	29,62
02/05/2017	29,48	29,28	29,38
04/05/2017	29,31	29,19	29,25
05/05/2017	29,30	29,41	29,36

Anexo 4

Tabela 20 - Valor médio de teor de sólidos obtidos para o método refratométrico e para o método de estufa.

Data da amostra	Teor de sólidos (%)		Diferença (A-B)
	Refratometria (A)	Método de estufa (B)	
18/10/2016	35,10	34,20	0,90
19/10/2016	33,71	33,12	0,59
20/10/2016	38,01	37,43	0,58
21/10/2016	36,50	35,54	0,96
24/10/2016	37,10	35,87	1,23
02/11/2016	35,70	34,42	1,28
07/12/2016	36,20	34,44	1,76
13/12/2016	35,60	35,01	0,59
14/12/2016	34,70	33,68	1,02
15/12/2016	35,80	34,60	1,20
16/12/2016	36,10	34,81	1,29
19/12/2016	35,80	34,89	0,91
20/12/2016	35,30	34,13	1,17
21/12/2016	35,00	33,65	1,35
22/12/2016	35,80	35,08	0,72
23/12/2016	35,50	34,83	0,67
27/12/2016	35,90	34,88	1,02
28/12/2016	35,60	34,70	0,90
29/12/2016	35,80	34,71	1,09
03/01/2017	35,30	35,26	0,04
09/01/2017	35,10	33,69	1,41
11/01/2017	35,50	34,15	1,35
12/01/2017	35,40	34,08	1,32
13/01/2017	35,10	34,31	0,79
16/01/2017	35,51	34,22	1,29
18/01/2017	35,00	33,95	1,05
20/01/2017	34,60	33,93	0,67
23/01/2017	35,00	33,88	1,12
		Média	1,01

		Teor de sólidos (%)	Dextrose Equivalente (%)		
Data da amostra	Amostra	Método de estufa	R Accu-chek (médio)	Método Lane-Eynon	F
19/10/2016	1	33,12	260	41,21	5,26
21/10/2016	2	35,54	282	43,17	5,43
02/11/2016	3	34,42	260	38,94	5,16
13/12/2016	4	35,01	272	41,24	5,30
14/12/2016	5	33,68	273	44,49	5,50
15/12/2016	6	34,60	288	43,65	5,25
07/12/2016	7	34,44	285	42,43	5,13
22/12/2016	8	35,08	282	42,69	5,31
23/12/2016	9	34,83	265	43,41	5,72
27/12/2016	10	34,88	274	41,15	5,24
03/01/2017	11	35,26	259	42,75	5,83
11/01/2017	12	34,15	264	40,51	5,23
12/01/2017	13	34,08	268	41,14	5,23
16/01/2017	14	34,22	257	39,95	5,31
18/01/2017	15	33,95	262	39,73	5,15
19/12/2017	16	34,89	269	45,76	5,93
23/01/2017	17	33,88	255	39,6	5,27
24/01/2017	18	33,89	257	40,39	5,33
25/01/2017	19	33,41	241	38,73	5,38
26/01/2017	20	33,87	253	39,37	5,27
				Média	5,36

Anexo 5

Tabela 21 – Resultados obtidos de TS, DE por potenciometria e leituras (R) médias de cada Accu-chek para as 20 amostras de CHE para determinação do fator de conversão

Amostras	Teor de Sólido por Estufa	DE por potenciometria	L médias dos Accu-cheks		
			(A)	(B)	(C)
1	34,7	47,64	293,5	307,0	311,0
2	35,1	47,06	299,0	302,5	310,0
3	35,1	47,17	293,5	304,0	306,0
4	35,2	47,57	288,0	291,5	294,0
5	35,1	47,20	293,0	310,5	306,0
6	35,1	47,50	304,0	299,5	298,5
7	34,2	47,65	293,0	317,0	317,5
8	34,2	47,91	308,0	307,0	308,0
9	34,2	48,26	304,5	305,0	310,0
10	34,2	47,55	302,5	308,5	310,5
11	34,1	48,10	306,5	308,5	310,5
12	34,5	48,54	278,5	302,0	296,5
13	34,3	48,86	295,0	303,5	306,0
14	34,4	48,84	290,0	302,5	303,0
15	34,4	48,58	300,0	303,0	305,5
16	34,7	47,83	290,5	305,0	312,0
17	34,7	47,98	290,5	311,5	313,0
18	34,8	47,95	290,5	310,5	305,0
19	34,6	48,14	297,5	298,0	303,5
20	34,3	48,66	290,0	304,5	309,0

Tabela 22 – Resultados de DE obtidos pelo método de referência (R) e pelos aparelhos Accu-check das 20 amostras; diferenças obtidas entre o método de referência e cada aparelho.

Amostras	DE Ref. (R)	DE Aviva (A)	DE Performa (B)	DE Performa (C)	(R-A)	(R-B)	(R-C)
1	47,64	46,84	47,43	47,78	0,80	0,21	-0,14
2	47,06	47,73	46,74	47,63	-0,67	0,32	-0,57
3	47,17	46,85	46,97	47,01	0,32	0,20	0,16
4	47,57	45,84	44,91	45,04	1,73	2,65	2,53
5	47,20	46,77	47,97	47,01	0,43	-0,77	0,19
6	47,50	48,52	46,27	45,86	-1,02	1,23	1,64
7	47,65	47,71	49,97	49,77	-0,07	-2,33	-2,12
8	47,91	50,16	48,39	48,28	-2,24	-0,48	-0,37
9	48,26	49,74	48,22	48,73	-1,48	0,04	-0,48
10	47,55	49,26	48,63	48,67	-1,71	-1,08	-1,12
11	48,10	49,92	48,63	48,67	-1,81	-0,53	-0,57
12	48,54	45,09	47,33	46,21	3,45	1,21	2,33
13	48,86	47,76	47,57	47,69	1,10	1,30	1,18
14	48,84	46,96	47,41	47,22	1,89	1,43	1,62
15	48,58	48,57	47,49	47,61	0,00	1,08	0,96
16	47,83	46,90	47,67	48,48	0,94	0,17	-0,65
17	47,98	46,91	48,68	48,64	1,07	-0,70	-0,66
18	47,95	46,77	48,39	47,26	1,18	-0,44	0,69
19	48,14	48,02	46,57	47,16	0,12	1,57	0,98
20	48,66	46,96	47,72	48,16	1,70	0,93	0,50
Média					0,29	0,30	0,31

Tabela 23 - Resultados de DE de 10 amostras de CHE obtidos pelo método de referência (R) e pelos aparelhos Accu-chek (B e C); diferenças obtidas entre o método de referência e cada aparelho.

Amostra	Valores médios de DE:				
	Método potenciométrico (R)	<i>Accu-chek Performa</i> (B)	Diferença (R-B)	<i>Accu-chek Performa</i> (C)	Diferença (R-C)
1	45,26	47,95	2,69	48,71	3,45
2	45,43	48,50	3,07	48,31	2,88
3	46,07	46,60	0,53	43,88	-2,19
4	45,99	45,88	-0,11	45,31	-0,68
5	46,55	44,71	-1,84	44,70	-1,85
6	46,51	46,73	0,22	45,62	-0,89
7	44,39	48,21	3,82	48,02	3,63
8	45,82	47,25	1,43	46,05	0,23
9	45,63	48,27	2,64	48,31	2,68
10	45,51	47,80	2,29	46,83	1,32

Anexo 6

Tabela 24 – Resultados de DE referentes à amostra de Referência BFF – 1 2017;

Amostra de Referência BFF - 1 2017	
Data	DE
12/04/2017	20,02
	20,25
20/04/2017	21,48
	21,46
21/04/2017	21,82
	21,90
26/04/2017	21,56
	21,46
27/04/2017	21,56
	21,59
28/04/2017	21,60
	21,72
02/05/2017	21,04
	21,18

Tabela 25 - Resultados de DE referentes à amostra de Referência BFF – 2 2017;

Amostra de Referência BFF - 2 2017	
Data	DE
12/04/2017	3,73
	3,72
20/04/2017	3,96
	3,97
21/04/2017	3,97
	3,78
26/04/2017	3,68
	3,75
27/04/2017	3,81
	3,72
28/04/2017	3,96
	3,99
02/05/2017	3,82
	3,70